

TATIANA ALVES RODRIGUES CABRAL

IL-4 E A SOBREVIVÊNCIA DE NEURÔNIOS CENTRAIS

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Cultura de Tecidos Hertha Meyer do Departamento de Neurobiologia, Programa de Neuroimunologia, Instituto de Biologia – UFF.

Dissertação de mestrado submetida à Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Neuroimunologia

Orientador: Prof^a. ELIZABETH GIESTAL DE ARAUJO

**NITERÓI
2006**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

TATIANA ALVES RODRIGUES CABRAL

IL-4 E A SOBREVIDA DE NEURÔNIOS CENTRAIS

Dissertação de mestrado submetida à
Universidade Federal Fluminense
como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em
Neuroimunologia

BANCA EXAMINADORA

REVISOR E SUPLENTE

Isabel Christina de Palmer Paixão Frugulhetti

NITERÓI
2006

“Feliz aquele que se entrega às
palavras do Senhor;

Aquele que as guarda no coração
será sempre sábio,

Pois, se as cumprir, será capaz de
todas as coisas,

porque a luz de Deus guiará seus
passos.”

(Eclesiástico 50, 30-31)

Dedico este meu trabalho às
pessoas mais importantes da
minha vida: meus pais, meu
marido e meu filho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades que surgiram em minha vida e pela força para superar as dificuldades. Obrigada pelas minhas conquistas e pelas graças alcançadas!

Aos meus pais, Celso e Marina, por todo apoio, dedicação e amor. Vocês são para mim exemplos de vida! Obrigada por tudo!!!

Ao meu marido, Fábio, que esteve ao meu lado durante todo o tempo, mostrando-me que tudo é possível. Obrigada por ter me ajudado a vencer o maior desafio da minha vida. Essa é uma conquista nossa! Te amo muito!

Ao meu filho, João Vitor, que chegou para encher a minha vida de alegria. Te amo demais, meu 'pequeno'!

Ao meu irmão, Leandro, e a minha cunhada Mara, que sempre torceram pelo meu sucesso. Valeu!

À Beth, pelo exemplo de dedicação e responsabilidade. Obrigada pela confiança, pelo apoio e pelo carinho!

À Andreza, pela amizade verdadeira de todos esses anos. Obrigada pela ajuda, pelo companheirismo e pelas longas horas de conversa!

Aos amigos do laboratório pelo acolhimento e companheirismo. Vocês fazem do ambiente de pesquisa um lugar agradável e divertido. Obrigada pelo aprendizado e pelas boas risadas!

A minha sogra Gerçi, que me acolheu com carinho em sua casa e que sempre acreditou nessa minha conquista.

As minhas amigas Maria e Genilda, por toda a atenção e pela ajuda com o pequeno João Vitor. Sem vocês tudo seria mais difícil.

À Tati, Lene e Francilene que serão sempre grandes amigas. Não me esqueceria de vocês nunca!

MUITO OBRIGADA!!!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	viii
Resumo	xi
Abstract	xii
1. Introdução	
1.1- Células gliais e suas interações com os neurônios	1
1.2- A retina	5
1.3- Morte Celular Natural	10
1.4- Morte Celular Natural e Neurotrofinas	13
1.5- Estudo da Morte Celular Natural	16
1.6- Citocinas	19
1.7- Interleucina-4	21
1.7.1- Vias de sinalização induzidas pela IL-4	24
1.7.2- Cooperação entre IL-4 e outros sinais	28
1.7.3- Funções da IL-4 no Sistema Nervoso	30
2. Objetivos	33
3. Materiais e métodos	
3.1- Materiais	34
3.2- Animais Utilizados	34
3.3- Injeção de Peroxidase para a Marcação das Células Ganglionares	34
3.4- Protocolo para Cultura de Células Mistas	35
3.4.1- Tratamento com IL-4 na Ausência de Soro Fetal Bovino	36
3.4.2- Tratamento com IL-4 e BDNF	36
3.5- Protocolo para Cultura de Células Gliais	37
3.6- Fixação das Culturas para Revelação da Peroxidase	39
3.7- Revelação da Peroxidase	39
3.8- Avaliação do Número de Células Ganglionares	40

4. Resultados	41
5. Discussão	53
6. Conclusões	60
7. Perspectivas futuras	62
8. Referências bibliográficas	63

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPe	- 3' 5' – Adenosina monofosfato cíclico
Anti-IgM	- Anti- imunoglobulina M
ATP	- Adenosina trifosfato
BAPTA	- Ácido tetraacético 1,2-bis aminofenoxi etano
BCGF-1	- Fator de crescimento de células B-1
Bcl-2	- Proteína do linfoma de célula B -2
Bcl-xl	- Proteína do linfoma de célula B na sua forma longa
BDNF	- Fator neurotrófico derivado do cérebro
BFA	- Brefeldina A
BSF-1	- Fator estimulante de células B -1
Ca⁺²	- Cálcio
CCG	- Camada de células ganglionares
CGR	- Células ganglionares da retina
CMF	- Salina sem cálcio e sem magnésio
CNE	- Camada nuclear externa
CNI	- Camada nuclear interna
CO₂	- Dióxido de carbono
CPE	- Camada plexiforme externa
CPI	- Camada plexiforme interna
CT	- Controle
DMSO	- Dimetilsulfoxeido
DNA	- ácido desoxirribonucléico
E14	- Dia embrionário 14
E20	- Dia embrionário 20
FdUr	- Fluorodeoxiuridina
GABA	- Ácido γ -aminobutírico
GFAP	- Proteína fibrilar ácida glial
H⁺	- Hidrogênio

HRP	- Peroxidase
IFN-γ	- Interferon gama
IgE	- Imunoglobulina E
IgG1	- Imunoglobulina G1
IL-1	- Interleucina-1
IL-1 β	- Interleucina-1 beta
IL-2	- Interleucina-2
IL-3	- Interleucina 3
IL-4	- Interleucina-4
IL-4R	- Receptor para interleucina-4
IL-7	- Interleucina-7
IL-9	- Interleucina-9
IL-13	- Interleucina-13
IL-15	- Interleucina-15
IRS-2	- Substrato do receptor de insulina-2
Jaks	- Janus cinases
K⁺	- Potássio
LPS	- Lipopolissacarídeos
M1	- Receptores muscarínicos tipo 1
NGF	- Fator de crescimento do nervo
NRE-BP	- Proteína de ligação do elemento de regulação negativa
NT- 3	- Neurotrifina- 3
NT- 4/5	- Neurotrofina -4/5
NT- 6	- Neurotrofina- 6
P0	- Dia pós-natal 0
P2	- Dia pós-natal 2
P10	- Dia pós-natal 10
P13	- Dia pós-natal 13
p75	- Receptor de baixa afinidade para neurotrofinas (proteína de 75 Kd)
PKA	- Proteína cinase A
PKC	- Proteína cinase C

RNA_m	- Ácido ribonucléico mensageiro
RT-PCR	- Reação de cadeia de polimerase
SNC	- Sistema nervoso central
SNP	- Sistema nervoso periférico
Src	- Proteína tirosina cinase isolada de sarcoma de retina de pinto
STAT	- Sinal transdutor e ativador de transcrição
TMB	- Tetrametilbenzidina
TNF-α	- Fator de necrose tumoral alfa
Trk	- Tirosina cinase
Trk A	- Tirosina cinase A
Trk B	- Tirosina cinase B
Trk C	- Tirosina cinase C

RESUMO

A Interleucina-4 (IL-4) desempenha um importante papel neuroprotetor no sistema nervoso central. O objetivo deste trabalho foi investigar as vias de sinalização ativadas pela IL-4 no aumento da sobrevivência das células ganglionares da retina (CGR), bem como analisar o envolvimento de neurotrofinas e o papel de células gliais nesse efeito. Nossos resultados demonstraram que o soro fetal bovino presente em nossas culturas não influencia o aumento de sobrevivência das CGR mediado pelo tratamento com IL-4 por 48h e que o tratamento com IL-4 por 24 horas não é suficiente para induzir esse efeito. Ao utilizarmos um bloqueador de canais de cálcio dependente do tipo L (nifedipina, 5 μ M) e um inibidor de receptores Trk (K252a, 50nM) observamos um bloqueio do efeito da IL-4, ao contrário do observado com o inibidor de Src (PP1, 1:1000). No tratamento com subdoses de IL-4 e BDNF houve uma soma de seus efeitos, sugerindo que esses fatores compartilhem uma mesma via de sinalização intracelular. O quelante de cálcio intracelular (BAPTA, 20 μ M) e o inibidor de liberação vesicular de polipeptídeos (BFA, 30ng/mL), por sua vez, não bloquearam o aumento de sobrevivência induzido pelo BDNF, mostrando que essa neurotrofina encontra-se numa etapa posterior da via de sinalização. Nossos resultados mostraram ainda um aumento na sobrevivência das CGR plaqueadas sobre monocamadas gliais estimuladas previamente com IL-4, efeito bloqueado pela BFA e pelo K252a. Esses dados sugerem que a ação da IL-4 sobre seus receptores nas células de Müller possa estar induzindo uma liberação de moléculas de ação autócrina e/ou a expressão de receptores nestas células. As células gliais modificadas, por sua vez, estariam liberando moléculas tróficas e/ou de adesão capazes de aumentar a sobrevivência das CGR.

ABSTRACT

Interleukin-4 (IL-4) plays an important neuroprotective role in the central nervous system. The aim of this work was to investigate the signaling pathways involved in the effect of IL-4 on retinal ganglion cell survival (RGC). We also analyzed either the involvement of neurotrophin or glial cells on this effect. Our results clearly show that 5U/mL IL-4 increased RGC survival even when fetal bovine serum was not present in our cultures. Treatment with IL-4 for 24 hours did not enhance cell survival after 48 hours. The inhibitors of L type Ca^{2+} channels (5 μM nifedipine) and the Trk receptor (50nM K252a) completely blocked the effect of IL-4 whereas the Src inhibitor (1:1M PP1) was not able to block the IL-4 effect. Subdoses of IL-4 and BDNF were able to induce an increase in RGC survival suggesting that these factors share the same signaling pathway. An intracellular Ca^{2+} chelator (20 μM BAPTA) and an inhibitor of polypeptide release (30ng/mL Brefeldin A) were not able to block the BDNF effect on RGC survival. These results indicate that BDNF is downstream in the signaling pathway. The data presented also demonstrated an increase in RGC survival when cells were placed on glial cells monolayers previously treated with IL-4 (5U/mL). This effect was blocked by Brefeldin A (30ng/mL) and K252a (50nM). Our results indicate that treatment of glial cells with IL-4 induce an increase in retinal ganglion cells survival. The effect of IL-4 on glial cells, involves the release of polypeptides or receptor expression and activation of Trk receptors. In conclusion, IL-4 may play an important role during the development of the nervous system controlling the survival of neuronal cells. An effect mediated by glial cells.

1. INTRODUÇÃO

1.1- Células gliais e suas interações com os neurônios

Durante décadas neurocientistas acreditaram que os neurônios fossem os únicos responsáveis por toda a comunicação no sistema nervoso mesmo sendo as células gliais muito mais numerosas (existe um neurônio para nove células gliais). A única função atribuída a essas células era de suporte estrutural para as células nervosas. No entanto, com o advento de novas técnicas e com a mudança do enfoque experimental, mostrou-se que as células gliais são capazes de se comunicar entre si e com os neurônios, sendo determinantes para a homeostasia do sistema nervoso (Fields, 2004).

A interação morfofuncional entre neurônio e glia foi primeiramente proposta em 1960 por Hyden (Hyden, 1960). Ultimamente, um grande número de resultados experimentais demonstram que células gliais interagem com neurônios de maneira mais complexa promovendo tanto suporte trófico, como metabólico e estrutural. Tal é a importância destas células e destas interações que hoje em dia os estudos sobre as interações neurônio-glia fazem parte dos modernos livros de neurobiologia.

Os principais tipos celulares que constituem a população glial no SNC (astrócitos, oligodendrócitos e microglia) encontram-se intimamente relacionados com os neurônios tanto durante o desenvolvimento do sistema nervoso, contribuindo para a formação estrutural de diversas áreas (Kettenmann e Ransom, 1995), como na fase adulta, mantendo a homeostase do sistema nervoso maduro (Banker, 1980). A figura abaixo (Figura 1) ilustra os principais tipos de células gliais presentes no SNC.

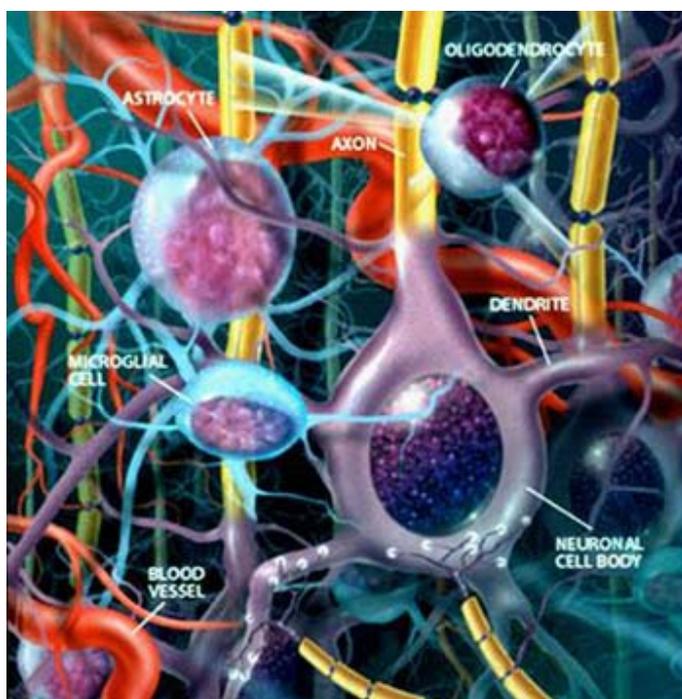


Figura 1- Principais tipos celulares que constituem a população glial no SNC: astrócitos, oligodendrócitos e microglia. Retirado de: www.cnsfoundation.org. Acessado em: 05/2006.

A inter-relação célula-célula ocorre através do espaço extracelular do SNC, permitindo a difusão de íons, de neurotransmissores e de outras substâncias neuroativas, constituindo-se assim em um importante canal de comunicação. Esse tipo

de interação participa em fenômenos de plasticidade, medeia a sensibilidade à dor, está envolvida no processo de formação de memória, faz parte dos mecanismos fisiológicos do sono, entre outros (Syková, 1997).

Estudos recentes têm demonstrado que a glia desempenha um papel vital na atividade, no desenvolvimento e na plasticidade neuronal, além de mediar sobrevivência, maturação e recuperação dos neurônios após injúria. Células gliais secretam fatores de crescimento, componentes de matriz extracelular e outros fatores tróficos que medeiam a sobrevivência de longo e curto prazo, assim como o crescimento e a retração de conexões sinápticas (Auld e Robitaille, 2003, para revisão). Além disso, expressam uma gama variada de canais iônicos, de receptores para neurotransmissores e de transportadores que juntos as tornam capazes de responder a uma série de sinais e modular respostas neuronais (Villegas *et al.*, 2003).

Células gliais liberam neurotransmissores (como ATP e glutamato), principalmente por exocitose dependente de cálcio; comunicam-se com neurônios e entre si através de junções comunicantes, produzem e liberam uma série de substâncias neuroativas, em condições fisiológicas e funcionais (Pasti *et al.*, 1997). Com isso, este tipo celular ao localizar-se em regiões perisinápticas, no SNC e SNP, em vertebrados e invertebrados, podem modular a eficácia e a plasticidade sináptica. Pelo sistema de comunicação neuro-glial, a condução de informações nos neurônios pode ser

influenciada por células gliais em resposta à atividade sináptica local (modulação recíproca) ou à atividade no sincício glial (modulação introduzida extrinsecamente). Em ambos os casos, as sinapses apresentam papel importante na neuromodulação (Auld e Robitaille, 2003).

Provavelmente uma das descobertas mais interessantes relacionadas às funções gliais consiste no seu papel na geração de novas células neuronais no cérebro maduro. Atualmente, existem várias evidências de que células-tronco neuronais persistem na fase adulta e que estas células além de darem suporte à neurogênese, apresentam características de glia. Portanto, alguns tipos de células gliais podem constituir células-tronco neuronais enquanto outros tipos são capazes de regular a neurogênese (Villegas *et al.*, 2003).

Algumas células gliais destacam-se por fazer parte da barreira hematoencefálica, participando do controle das trocas entre vasos sanguíneos e neurônios. Elas contribuem para o suprimento de energia pela translocação de substratos metabólico/energéticos da circulação para o sincício glial, para que sejam convertidos em lactato e transferidos para os neurônios (Hertz *et al.*, 1996).

O processo de mielinização no SNC, por sua vez, parece ser regulado tanto por um programa intrínseco de produção de componentes da mielina nos oligodendrócitos

como pela atividade neuronal (Stevens *et al.*, 2002). Na ausência da glia (ilustrada na figura 2), a transferência de mensagens se torna ineficiente enquanto na sua presença as conexões raramente falham e as células nervosas se tornam capazes de transmitir sinais com maior frequência e intensidade (Villegas *et al.*, 2003).

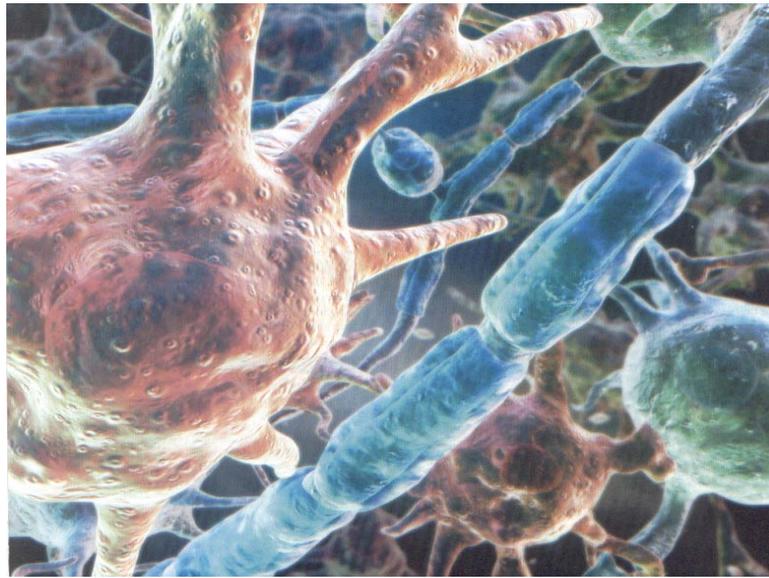


Figura 2– Células gliais (vermelho). Retirado de Scientific American – O lado esquecido do cérebro, Ano 2, n°24, maio de 2004.

1.2- A retina

A retina é um tecido delgado e translúcido, extremamente organizado, que faz parte do sistema nervoso central (Dowling, 1991). Sua localização periférica privilegiada, permite fácil obtenção, livre de tecido conjuntivo adjacente e de outras

populações neuronais e gliais. Esta característica, aliada ao fato de possuir um número limitado de tipos celulares e apresentar diferentes circuitos de neurotransmissores, torna a retina um excelente modelo experimental para o estudo do desenvolvimento, diferenciação e manutenção de células do tecido nervoso central *in vitro* e *in vivo* (Dowling, 1991). Além disso, a relação entre a retina e seus alvos centrais de projeção está amplamente documentada, tanto em animais adultos quanto durante o desenvolvimento (Carter *et al.*, 1991).

A retina madura apresenta organização em múltiplas camadas de corpos celulares (camadas nucleares) e de processos sinápticos (camadas plexiformes). No tecido adulto, as células podem ser identificadas por sua posição, estrutura, propriedades bioquímicas e função (Farber e Adler, 1986). Em vertebrados, estas camadas encontram-se dispostas anatomo-histologicamente da seguinte forma:

a) Camada nuclear externa (CNE) – encontram-se os corpos celulares dos fotorreceptores. Os segmentos externos dessas células contêm os elementos de transdução da retina (Farber e Adler, 1986 para revisão). Os fotorreceptores dividem-se em cones, responsáveis pela sensibilidade à luz intensa e pela visão a cores, e bastonetes, responsáveis pela adaptação da visão ao claro-escuro.

b) Camada plexiforme externa (CPE) – os prolongamentos dos fotorreceptores, células bipolares e horizontais fazem conexões entre si;

c) Camada nuclear interna (CNI) – encontram-se os corpos celulares das células bipolares, amácrinas, horizontais e de células ganglionares deslocadas;

d) Camada plexiforme interna (CPI) – ocorrem sinapses entre os prolongamentos de células bipolares, amácrinas e ganglionares;

e) Camada de células ganglionares (CCG) – encontram-se os corpos celulares de células ganglionares e amácrinas deslocadas (Cepko e Dyer, 2001).

Através dos axônios das células ganglionares, a retina envia sinais para os colículos superiores, tectum óptico, núcleos do pré-tectum e núcleo geniculado lateral (von Bartheld, 1998 para revisão).

O tipo glial predominante na retina são as células de Müller, cujos prolongamentos se estendem verticalmente por todas as camadas retinianas e seus corpos celulares localizam-se preferencialmente na CNI (Kolb, 1994; Wässle e Boycot, 1991 para revisão).

As células de Müller exercem diversas funções desempenhadas pelos oligodendrócitos e astrócitos em outras regiões do sistema nervoso central. Expressam numerosos canais voltagem-dependentes e receptores para neurotransmissores, sendo capazes de reconhecer uma variedade de sinais neuronais levando à despolarização

celular e gerando ondas intracelulares de Ca^{2+} . Dessa forma, modulam a atividade neuronal, regulando as concentrações extracelulares de substâncias neuroativas, incluindo K^+ , H^+ , glutamato e GABA. A comunicação entre as células de Müller e neurônios retinianos indica que essas células gliais desempenham um papel ativo na função da retina (Newman e Reichenbach, 1996).

A gênese das células retinianas é controlada por fatores mitóticos e a diferenciação por outros fatores, ambos presentes no tecido. Os estudos da neurogênese da retina de ratos demonstram que as células ganglionares são sempre as primeiras a serem geradas, entre E14 e E20, ou seja, entre o 14° e o 20° dia embrionário (Reese e Colello, 1992). As células de Müller, por sua vez, têm um período de gênese compreendido entre E20 e P13, 20° dia embrionário e 13° dia pós-natal (Cepko, 1993).

A retina de ratos no dia pós-natal 0 (P0) ainda é bastante imatura, sendo principalmente formada por retinoblastos. Apenas as células amácrinas e as células ganglionares já se encontram fora do ciclo mitótico e localizadas em suas respectivas camadas durante esse período (Cepko, 1993). A seguir, encontra-se representado um esquema da estrutura retiniana imatura e na fase adulta.

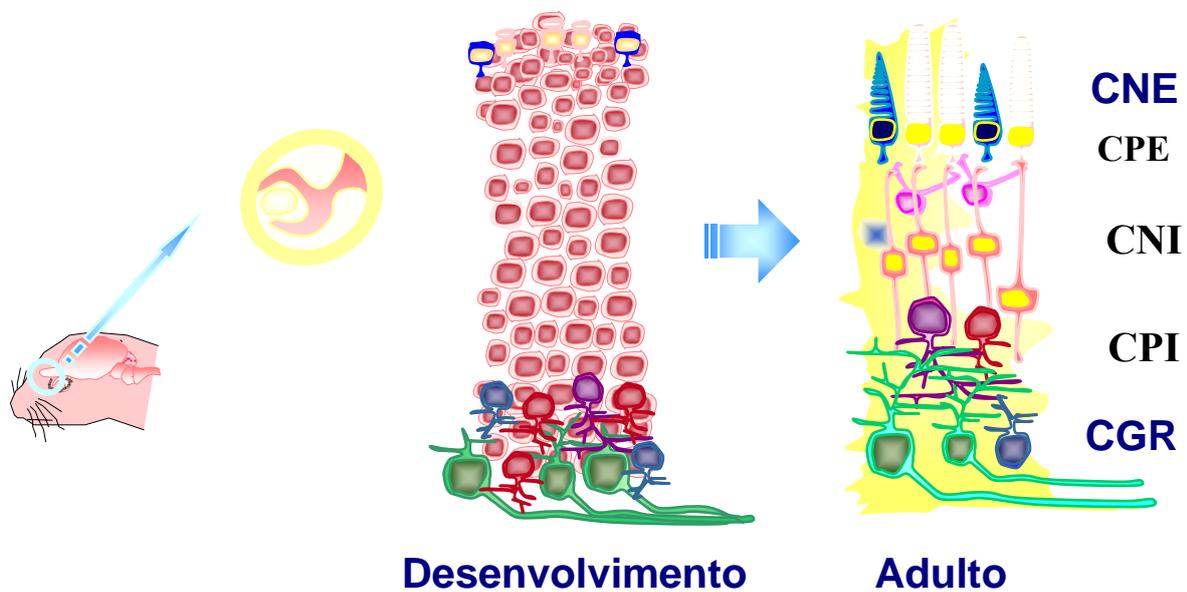


Figura 3 – Representação estrutural da retina no dia do nascimento e na fase adulta. A figura do desenvolvimento mostra a camada de células ganglionares da retina (verde) e a presença de células amácrinas diferenciadas deslocadas nessa camada (vermelhas e roxas), o restante representa a camada neuroblástica de células ainda em diferenciação. Na retina adulta podemos observar todas as camadas já diferenciadas, sendo: camada nuclear externa (CNE), camada plexiforme externa (CPE), camada nuclear interna (CNI), camada plexiforme interna (CPI) e camada de células ganglionares da retina (CGR). Em amarelo está representada a célula de Müller. Adaptado de Sholl-Franco, 2001.

No período pós-natal, as células ganglionares se encontram em processo de morte celular natural. Na retina de ratos, este período degenerativo ocorre de P0 a P10 sendo que nos primeiros cinco dias a degeneração apresenta-se mais acentuada. Aproximadamente 50% das células ganglionares inicialmente geradas morrem em decorrência deste fenômeno regressivo (Linden e Perry, 1982).

Quando axotomizadas, aproximadamente 80% das células ganglionares de ratos neonatos morrem por apoptose nas primeiras 24h (Rabacchi *et al.*, 1994). Vários experimentos *in vitro* corroboram a hipótese do efeito dos fatores tróficos no controle da sobrevivência das células ganglionares (Armson *et al.*, 1987).

1.3- Morte Celular Natural

O desenvolvimento de um organismo pluricelular é caracterizado por diferentes etapas que irão permitir a funcionalidade e a interação dos diferentes sistemas que o compõem. Uma série de eventos que obedecem a uma seqüência ordenada são necessários para a sobrevivência celular. Da mesma forma, as etapas que constituem o desenvolvimento do sistema nervoso apresentam uma seqüência temporal de eventos progressivos e regressivos que asseguram sua perfeita funcionalidade. Para que ocorra a estabilidade e a sobrevivência de uma população neuronal é necessário haver uma integração dessa população com os diferentes tipos celulares que compõem este determinado sistema (Pereira e Araujo, 2000).

Dentre os diversos fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento do sistema nervoso, a morte celular natural foi extensamente estudada durante a década de 70 e o início dos anos 80 (Cowan, 1979; Oppenheim, 1981; Hamburger e Oppenheim, 1982). No sistema nervoso, a pesquisa e o interesse em torno deste evento têm sido

cada vez maiores, uma vez que está diretamente relacionado a fenômenos degenerativos que ocorrem durante o seu desenvolvimento e a doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer (Oslon *et al.*, 1994; Cowburn *et al.*, 1996; Knusel e Gao, 1996; Mattson e Furukawa, 1996).

A morte celular natural é, na verdade, um mecanismo fisiológico usado por organismos multicelulares tanto durante a morfogênese, para controlar o número de células presentes em um tecido, como durante a vida adulta, participando de uma estratégia defensiva para a remoção de células infectadas, danificadas ou mutantes (Vaux e Korsmeyer, 1999).

Pelo menos 3 modos diferentes de morte celular natural podem ser adotadas por neurônios em desenvolvimento: apoptótica, autofágica e citoplasmática. Os três tipos representam a perda de células individuais em tempo específico, sem acarretar resposta inflamatória, o que os caracterizam como morte celular programada e os diferem da necrose (Oppenheim, 1999).

Admite-se, atualmente, que a principal forma de morte celular natural seja por apoptose (Bowen, 1993; Evans, 1993). Este evento de eliminação celular tem como características principais a perda do volume da célula, a condensação da cromatina, a fragmentação organizada do DNA em oligonucleossomas, a manutenção da estrutura das organelas e da membrana plasmática até o seu rompimento e a fagocitose dos

corpúsculos apoptóticos por macrófagos e células vizinhas (Kerr, 2002 para revisão). Outro aspecto predominante acerca da apoptose consiste na ausência de resposta inflamatória no tecido, circunscrevendo a degeneração às células afetadas (Bär, 1996, para revisão).

A apoptose pode ser desencadeada pela sinalização através de receptores de membrana e/ou através de sinais de stress que acarretam respostas mitocondriais, a execução do programa apoptótico através das caspases e a eliminação das células afetadas sem nenhum dano ao micro-ambiente (Amarante-Mendes e Green, 1999). As caspases podem ser classificadas em dois grupos: as iniciadoras da cascata de sinalização e as efetoras da resposta que agem nos substratos nucleares levando à apoptose (Salvesen, 1999).

A ativação ou a supressão da apoptose são regulados em parte pelos membros da família Bcl-2, proteínas encontradas em várias membranas citoplasmáticas incluindo a membrana mitocondrial (Korsmeyer, 1999; Rathmell e Thompson, 1999). Alguns membros, dentre eles Bcl-2 e Bcl-xL, protegem contra o estímulo apoptótico e parecem agir preservando a integridade da membrana mitocondrial e prevenindo a liberação de citocromo C no citoplasma. Outros membros da família Bcl-2, como Bax e Bad, promovem a apoptose. Os níveis relativos de proteínas pró e anti-apoptóticas desta família são críticos em determinar a viabilidade da célula (Wurster *et al.*, 2002).

O processo necrótico, por sua vez, difere da apoptose por induzir uma tumefação citoplasmática e das organelas, sem mudanças nucleares. Essa tumefação leva à dissolução das organelas e ruptura da membrana plasmática com extravasamento do conteúdo citoplasmático, levando a uma resposta inflamatória (Schwartzman e Cidlowski, 1993, para revisão).

1.4- Morte Celular Natural e Neurotrofinas

Hamburger e Levi-Montalcini realizaram, no final dos anos 40, estudos pioneiros da morte celular natural em embriões de pinto e descobriram uma molécula capaz de regular a intensidade da degeneração neuronal. Esta molécula foi batizada de Fator de Crescimento do Nervo, NGF (Levi-Montalcini e Hamburger, 1951; Cohen *et al.*, 1954). Esta descoberta deu origem à teoria neurotrófica que sugere uma competição dos neurônios por substâncias liberadas por suas células alvo em quantidades limitadas (Oppenheim, 1991 para revisão). No entanto, o controle da sobrevivência neuronal é mais complexo do que o originalmente sugerido (Raff *et al.*, 1993) e moléculas tróficas provenientes de células aferentes também estariam envolvidas no controle de populações neuronais (Araujo e Linden, 1993).

A partir da descoberta do NGF, outras moléculas com atividade neurotrófica foram identificadas e isoladas. Atualmente a família das neurotrofinas em mamíferos compreende, além do NGF, o BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (Barde, 1988 para revisão), a NT-3 – neurotrofina 3 (Ernfors *et al.*, 1990), a NT-4/5 (Berkemeier *et al.*, 1991; Hallböök *et al.*, 1991) e a NT-6 (Gartner *et al.*, 2000).

Os mecanismos de sinalização celular das neurotrofinas compreendem a ativação de duas classes distintas de receptores: o receptor de baixa afinidade e os receptores de alta afinidade. Ao receptor de baixa afinidade, denominado p75, ligam-se todas as neurotrofinas e seu papel na sinalização neurotrófica é controverso e intrigante (Chao, 1994; Miller e Kaplan, 1998). Os receptores de alta afinidade fazem parte da família das Trks (tirosinas cinases) e a sua interação com as neurotrofinas ocorre da seguinte maneira: NGF ativa TrkA, BDNF e NT4/5 ativam TrkB e NT-3 ativa TrkC. No entanto, em situações singulares a NT-3 é capaz de ativar os receptores TrkA e TrkB (Barbacid, 1994; Davis, 1994 a e b).

Os receptores Trks apresentam um domínio de ligação extracelular, uma única α hélice transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosina cinase. A ligação da neurotrofina ao domínio extracelular provoca a oligomerização do receptor e este rearranjo permite que os domínios de cinases próximas, na cadeia do receptor, fosforilem um ao outro, num processo chamado de autofosforilação (Alberts *et al.*, 2004; Kaplan e Miller, 2000, para revisão). A ativação dos receptores Trks (Figura 4)

inicia cascatas de sinalização incluindo vias intracelulares que impedem a degeneração e resultam na diferenciação neuronal (Barbacid, 1994).

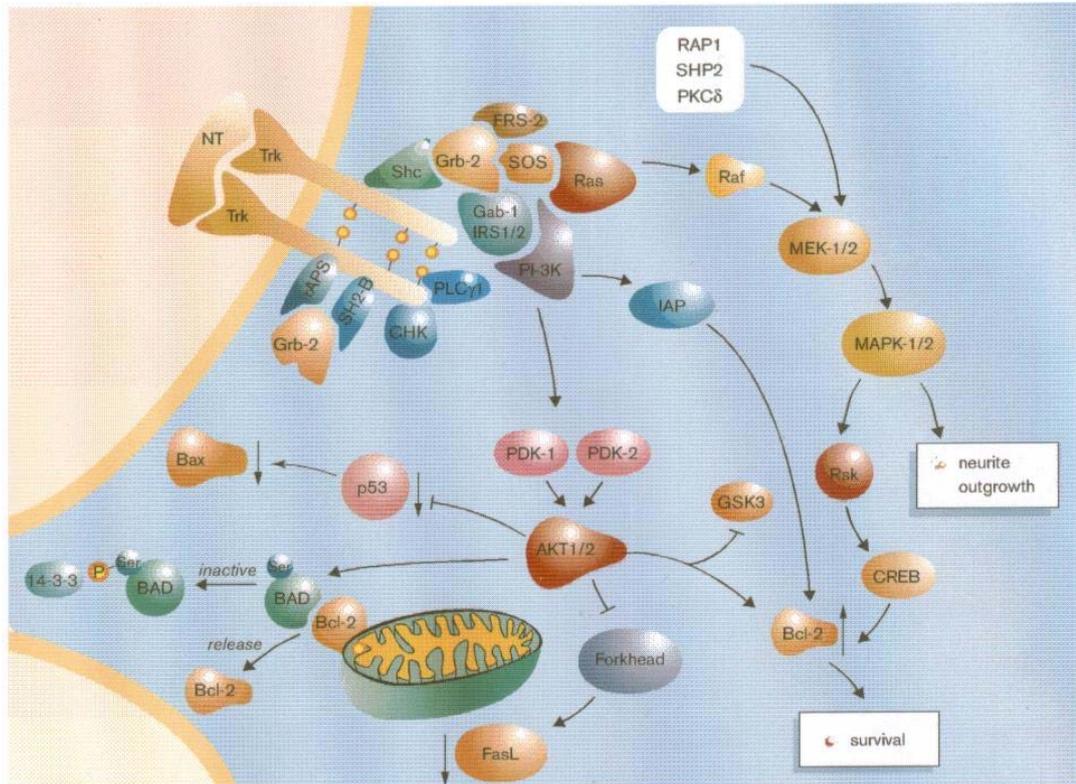


Figura 4- Esquema das vias de sinalização do receptor de alta afinidade para neurotrofinas. Kaplan e Miller, 2000.

Estudos recentes têm demonstrado que os receptores Trks podem ser transativados por receptores acoplados a proteína-G (Ferguson, 2003). Este fenômeno parece envolver autofosforilação e endocitose de Trk e parece recrutar tirosina cinases citoplasmáticas (Prenzen *et al.*, 1999). Resultados experimentais obtidos por Kotecha e colaboradores (2002), sugerem que a transativação de receptores Trk pode contribuir

não somente para a sobrevivência e diferenciação neuronal, mas também pode modular dinamicamente a transmissão sináptica.

Em relação ao receptor de baixa afinidade, foi visto recentemente que o p75, membro da superfamília dos receptores para o fator de necrose tumoral, apresenta alta afinidade pelo pro-NGF, que por sua vez possui pouca afinidade pelo TrkA. Ao se ligar ao p75, o pro-NGF se torna um potente indutor de morte neuronal. Esse dado foi capaz de mudar a compreensão da fisiologia das neurotrofinas e suas vias de sinalização (Ibáñez, 2002).

1.5- Estudo da Morte Celular Natural

As células ganglionares da retina (CGR) de ratos têm sido utilizadas por diferentes grupos de pesquisa como um modelo para o estudo da sobrevivência neuronal e de eventos ligados à morte celular natural *in vitro*.

Em 1982, McCaffery e colaboradores demonstraram que CGR de ratos albinos mantidas *in vitro* apresentavam uma taxa de degeneração de 80% após 24 horas. Os estudos mostraram, ainda, que células ganglionares cultivadas na presença de células da região diencefálica e mesencefálica tinham sua sobrevivência aumentada após as 24 horas *in vitro*, efeito não observado quando da presença de células do cerebelo. Esses

resultados levaram os autores a sugerir que o tecido alvo das células ganglionares pudesse produzir, de forma específica, moléculas tróficas importantes para o controle da sobrevivência dessas células.

Usando moléculas purificadas, Johnson e colaboradores, em 1986, publicaram um trabalho no qual demonstraram que o BDNF era capaz de manter a sobrevivência de CGR de ratos em cultura. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram que o NGF não era capaz de aumentar a sobrevivência das células ganglionares. Baseados nestes dados, os autores concluíram que o BDNF poderia ser a molécula trófica proveniente das células alvo. Leibrock e colaboradores (em 1989) isolaram RNAm para o BDNF do colículo superior de ratos o que corrobora a existência desta molécula trófica em áreas alvo para as células ganglionares da retina.

A participação das células de Müller no controle da sobrevivência das células ganglionares foi inicialmente evidenciada por Raju e Bennett, em 1986. Esses autores demonstraram que as células gliais são capazes de liberar fatores solúveis que aumentam a sobrevivência das ganglionares. Os resultados obtidos mostraram, ainda, que durante o desenvolvimento ocorre um período inicial onde os fatores tróficos de células de Müller são mais eficientes do que os fatores obtidos do colículo superior no aumento da sobrevivência das células ganglionares. Entretanto, à medida que o desenvolvimento se processa esta dependência é invertida.

A dependência por fatores tróficos de células-alvo e de células de Müller na sobrevivência das células ganglionares foi melhor estudada no trabalho de Armson e colaboradores em 1987. Esses autores sugeriram que durante o desenvolvimento as células ganglionares da retina são dependentes de fatores tróficos produzidos por diferentes populações celulares.

A presença de RNAm para neurotrofinas e seus receptores nas células ganglionares já foi demonstrada em diferentes estágios do desenvolvimento e em diferentes espécies (von Bartheld, 1998 para revisão). RNAm para o NGF e para o seu receptor de alta afinidade TrkA foram encontrados em CGR de ratos neonatos (Zanellato *et al.*, 1993; Rickman e Brecha, 1995), assim como foi observada a expressão de RNAm para o BDNF e seu receptor de alta afinidade TrkB em CGR de ratos adultos e neonatos (Jelsma *et al.*, 1993; Pérez e Caminos, 1995). A NT-4, por sua vez, promove a sobrevivência das células ganglionares em ratos em desenvolvimento e ratos adultos *in vitro* (Cohen *et al.*, 1994; Ary-Pires *et al.*, 1997), sendo capaz de impedir a morte celular natural das células ganglionares (Cui e Harvey, 1994). Essa neurotrofina compartilha com o BDNF o receptor de alta afinidade TrkB (Kaplan e Miller, 2000 para revisão). RNAm para TrkC foi detectado na camada de células ganglionares de ratos (Kittelerová *et al.*, 1995), porém NT-3 não promove a sobrevivência, crescimento neurítico ou axonal das células ganglionares de mamíferos (Sawai *et al.*, 1996).

Estudos das células ganglionares de mamíferos *in vivo* têm demonstrado que NGF, BDNF e NT-4 retardam a morte após lesão (Carmignoto *et al.*, 1989; Ehrlich *et al.*, 1990; Cui e Harvey, 1994; Aguayo *et al.*, 1996). Spalding e colaboradores em 2005 mostraram, em sua investigação sobre o efeito neuroprotetor transitório da NT-4/5, que as CGR em desenvolvimento não alteram sua dependência trófica para outros fatores de sobrevivência após injúria. A administração de neurotrofinas resulta, entretanto, em uma ‘down-regulation’ de receptores Trk-B, alterando a responsividade a longo prazo das células ganglionares a esses fatores tróficos.

1.6- Citocinas

As citocinas são moléculas de natureza polipeptídica, pequeno peso molecular, secretadas por vários tipos celulares após estimulação ou de maneira constitutiva (Holtmann e Resch, 1995; Cavaillon, 1994; Korshing, 1993; Arai *et al.*, 1990 para revisão). Atuam em receptores de alta afinidade presentes em populações celulares distintas, em vários tecidos e órgãos, induzindo respostas complexas com efeitos de curta e longa duração (Wells e Devos, 1996; Rose-John e Heinrich, 1994; Heaney e Golde, 1993 para revisão).

Esse nome genérico abrange várias classes de moléculas, destacando-se como as mais representativas os Fatores de Crescimento, as Neurotrofinas, as Interleucinas, os Interferons e outros fatores que são capazes de direcionar a diferenciação de uma

determinada população celular, tais como os Fatores Neuro-Hematopoiéticos (Holtmann e Resch, 1995; Patterson, 1993).

A ação pleiotrópica das citocinas deu base à formulação de um conceito único denominado de Rede de Citocinas (Holtmann e Resch, 1995; Arai *et al.*, 1990 para revisão), onde a redundância das interações representa um dos mecanismos presentes na atuação destas moléculas em suas células-alvo.

Nos últimos anos tem sido possível observar a ação de citocinas regulando a atividade neuronal ao longo do desenvolvimento até a idade adulta (Korshing, 1993; Ebendal, 1992 para revisão). Células residentes no SNC podem sintetizar, secretar e responder a citocinas inflamatórias, contribuindo não somente na resposta a lesões ou mudanças imunológicas, mas regulando seu próprio crescimento e potencial de diferenciação (Sawada *et al.*, 1995). A ação de moléculas antes denominadas próprias ao sistema imune em células pertencentes ao sistema nervoso, ou vice-versa, sugere uma interação e ou semelhanças funcionais entre esses dois sistemas.

Diversos estudos relacionados às ações das citocinas sobre o SNC abordam aspectos referentes ao crescimento, à diferenciação e à sobrevivência neuronal. Durante processos inflamatórios, células neuronais e gliais podem ser estimuladas por citocinas produzidas e liberadas por células imunes (Rothwell *et al.*, 1996). Neurônios e células gliais também são capazes de produzir citocinas promovendo assim

sobrevivência neuronal e diferenciação, crescimento neurítico, síntese e liberação de neurotransmissores, regulação hormonal e plasticidade neuronal (Hopkings e Rothwell, 1995; Patterson, 1993).

Microglia e astrócitos desempenham um papel crucial na Rede de Citocinas no SNC, produzindo e respondendo a uma variedade de citocinas, dentre elas a Interleucina-4. Sawada e colaboradores em 1995 mostraram, através do método de RT-PCR, a expressão de RNA mensageiro para receptores de IL-3 e IL-4 em microglia e oligodendrócitos, em cultura do cérebro de camundongo neonato.

1.7- Interleucina-4

As interleucinas são glicoproteínas produzidas por linfócitos T e B, células do estroma, macrófagos, fibroblastos ou por outros tipos celulares (Arai *et al.*, 1990; Locksley, 1991; Holtmann e Resch, 1995). Estão relacionadas com reações imunes e inflamatórias, podendo ainda desempenhar papéis significativos como mediadores químicos entre células do sistema imune e entre estas e células de outros sistemas.

Células do SNC são capazes de sintetizar, secretar e responder a interleucinas (Brodie *et al.*, 1998; Lovett-Racke *et al.*, 2000). Este fato não apenas contribui para a resposta imediata a lesões e para o processo de resposta imunológica dentro do

SNC, como também está implicado na regulação dos processos de desenvolvimento e diferenciação das células presentes nesse sistema (Sawada *et al.*, 1995).

A Interleucina-4 (IL-4) é uma citocina anti-inflamatória, que foi inicialmente descrita como um fator estimulante de células B (BSF-1) ou como fator-1 de crescimento de células B (BCGF-1), tendo a sua ação relacionada à proliferação dessas células quando da co-estimulação por anticorpos anti-IgM (Farrar *et al.*, 1983). Atualmente, tem sido descrita como uma citocina de ação pleiotrópica sobre várias populações celulares e pode atuar em vários estágios da diferenciação celular (Banchereau *et al.*, 1994; Duschl e Sebald, 1996).

A IL-4 promove a diferenciação de células T em células do tipo Th2 (Paul, 1991). Em linfócitos B, por sua vez, participa dos processos de ativação, proliferação e diferenciação, promovendo a produção de IgG1 e IgE (Coffman *et al.*, 1986; Vitetta *et al.*, 1985). Além disso, tem sido mostrado que a IL-4 atua como fator de sobrevivência prevenindo a apoptose de diferentes tipos celulares, incluindo células T e B e mastócitos (Foote *et al.*, 1996; Zamorano, *et al.*, 1996).

A IL-4 é uma glicoproteína composta por 129 aminoácidos, normalmente secretada por células T ativadas, mastócitos e basófilos. A sua estrutura molecular é formada por 4 α -hélices orientadas de forma 'up-up-down-down' (LaPort *et al.*, 2005)

e duas longas alças terminais (Mueller *et al.*, 2002), como observado na figura a seguir (Figura 5).

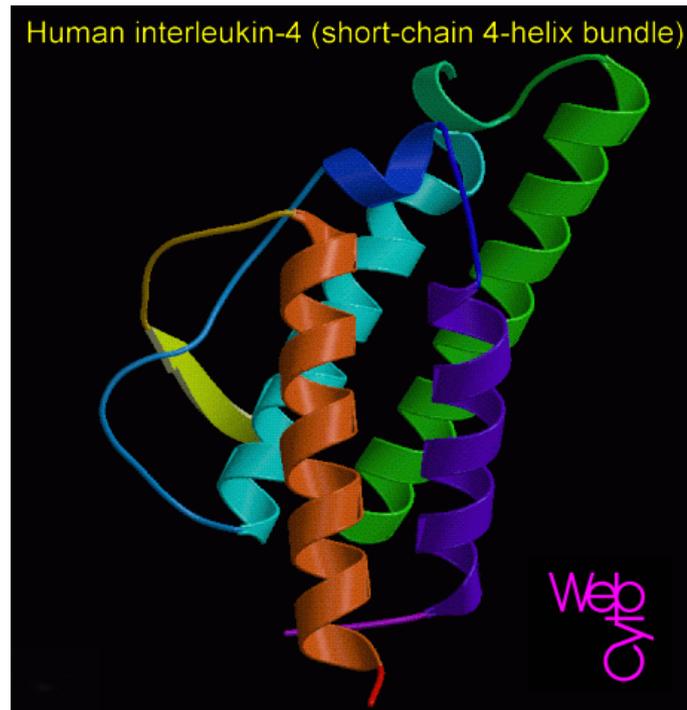


Figura 5: Representação espacial da estrutura molecular da interleucina-4. Fonte: www.mcl.d.co.uk/hiv. Acessado em: 05/2006.

As respostas induzidas pela IL-4 são mediadas por pelo menos dois tipos diferentes de complexo receptor na superfície celular (IL-4-R I e II). O tipo I contém a cadeia IL-4R- α , a subunidade que se liga com alta afinidade à molécula (Gallizi *et al.*, 1990; Keegan e Pierce, 1994) e a cadeia comum (β), a qual é compartilhada por outras citocinas como, por exemplo, a IL-2, IL-7, IL-9, IL-15 (Takaeshita *et al.*, 1992, para

revisão). O tipo II inclui a IL-4R α e o receptor de baixa afinidade para IL-13 (IL-13R α 1) (Miloux *et al.*, 1997).

1.7.1-Vias de sinalização induzidas pela IL-4

Os receptores de citocinas estão associados a uma classe de tirosina-cinases citoplasmáticas denominadas Janus cinases (Jaks). Ao serem ativadas, as Jaks fosforilam e ativam um grupo de proteínas reguladoras gênicas chamadas STATs (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) que se deslocam para o núcleo e estimulam a transcrição de genes específicos. A ligação da IL-4 ao seu receptor, por sua vez, resulta na ativação da Janus tirosina cinases Jak1 e Jak3 e de diversas proteínas celulares incluindo STAT6 (Hou *et al.*, 1994; Quelle *et al.*, 1995).

STAT6 é um fator de transcrição citoplasmático latente, recrutado especificamente para o receptor de IL-4 e ativado por fosforilação após a estimulação por esta citocina. Os homodímeros de STAT6 ativados são capazes de se deslocar para o núcleo onde podem influenciar a transcrição de genes responsivos a IL-4 (Wuster *et al.*, 2002).

Estudos realizados em linfócitos deficientes em STAT6 vêm demonstrando sua importância na transdução do sinal induzido pela IL-4. Estas células são incapazes de proliferar normalmente em resposta à esta citocina, são deficientes em ativar genes

responsivos a IL-4 e não são capazes de induzir a diferenciação de linfócitos em Th2 (Shimoda *et al.*, 1996; Takeda, 1996; Kaplan *et al.*, 1996). Entretanto, STAT6 não parece estar envolvido nos efeitos anti-apoptóticos da IL-4 em células T ou em linhagem de células mielóide (Vella, *et al.*, 1997; Zamorano e Keegan, 1998).

Ao contrário do observado em linfócitos T, a sinalização mediada por STAT6 está envolvida na atividade anti-apoptótica da IL-4 em células B primárias induzidas à morte pela retirada de fatores de crescimento ou ligação de Fas. Células B deficientes em STAT6 perdem sua habilidade em maximizar a expressão de Bcl-xL em resposta a estimulação pela IL-4 (Wurster *et al.*, 2002).

Ao longo dos anos, tem sido mostrado que, em células T ativadas, a IL-4 é capaz de induzir a ativação de um outro membro da família STAT, a STAT5. A fosforilação de STAT5 e STAT3 está relacionada à supressão da apoptose em diferentes populações celulares (Leonard e O'Shea, 1998).

Apesar do comprovado papel anti-apoptótico exercido pela IL-4 em diversos tipos celulares, estudos recentes mostram um potente efeito apoptótico da IL-4 em mastócitos e monócitos/macrófagos em desenvolvimento. Esse efeito é dose-dependente, necessita da presença da interleucina nos primeiros 8 dias em cultura e envolve danos mitocondriais e ativação de STAT6 (Bailey *et al.*, 2004).

Um outro mediador de sinalização já bem caracterizado que se liga diretamente ao receptor da IL-4 e é rapidamente fosforilado em linfócitos é o substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) (Sun *et al.*, 1995). Estudos *in vitro* de transfecção de receptores de IL-4 mutantes em células mielóides sugerem que IRS-2 está envolvido na regulação de sinais mitogênicos e anti-apoptóticos da IL-4 (Zamorano *et al.*, 1996; Ryan *et al.*, 1996). A ativação de IRS-2 resulta no recrutamento e ativação de fosfatidilinositol 3-quinase e ativação de Akt, o que resultaria na proteção contra a apoptose (Zamorano *et al.*, 1996). Ao contrário do observado com a STAT6, entretanto, células B purificadas de camundongos deficientes em IRS-2 são eficientemente resgatadas da morte celular pela IL-4 (Wurster *et al.*, 2002).

Uma via de sinalização adicional, induzida pela ativação do receptor da IL-4, tem sido relacionada ao resgate de células mielóides da apoptose (Zamorano e Keegan, 1998). Essa via resulta de um diferente resíduo de tirosina fosforilado no receptor da IL-4 que não é reconhecido por STAT6 ou IRS-2. Entretanto, a natureza dessa via ainda não foi definida.

Em linfócitos B humanos, a IL-4 também acarreta a hidrólise de inositol lipídeos e, após certo retardo, promove a elevação dos níveis intracelulares de AMPc (Finney, *et al.*, 1990).

Estudos usando agentes farmacológicos que mimetizam a expressão gênica induzida por IL-4 em células B mostram que a ativação das vias de PKA e PKC são necessárias para que ocorra a expressão de CD23 (Finney, *et al.*, 1990) ou CD 25 (Mckay e Cushley, 1996).

Em células B tonsilares de humanos, o aumento dos níveis de AMPc e a ativação de PKA induzidos pela IL-4 atenuam a atividade de NRE-BP (proteína de ligação do elemento de regulação negativa), aumentando a expressão de CD-25 e conseqüentemente gerando o sítio de ligação de alta afinidade para IL-2 (Mckay *et al.*, 2000).

A figura 6 ilustra as principais vias de sinalização estimuladas pela ativação do receptor pela IL-4.

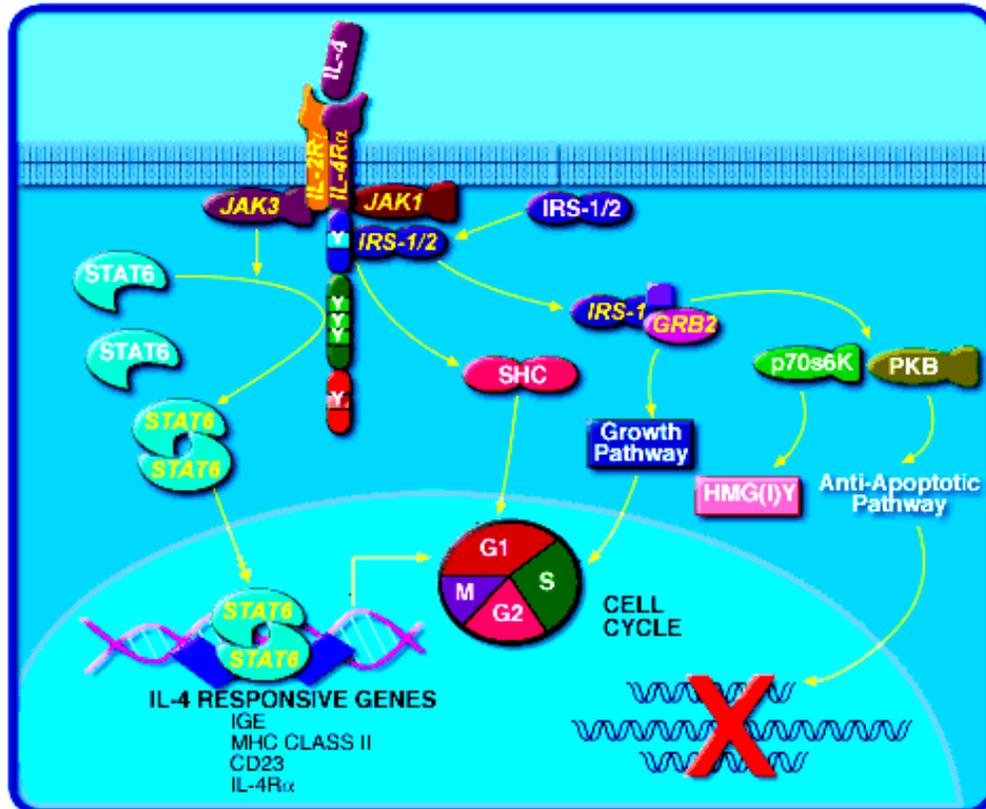


Figura 6: Ativação do receptor para IL-4 leva a ativação de vias de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular. Fonte: www.biocarta.com/pathfiles/il4pathways.asp. Acessado em: 05/2006

1.7.2- Cooperação entre IL-4 e outros sinais

As células, *in vivo*, estão expostas a uma variedade de sinais que ocorrem simultaneamente. Durante um processo inflamatório, por exemplo, as respostas celulares ocorrem como resultado de interação de uma variedade de moléculas de superfície celular e citocinas secretadas. Nesse contexto, a IL-4, embora por si só seja

capaz de induzir respostas celulares, também coopera com outros sinais que regulam respostas nas células, como LPS, TNF- α , IL-1 e CD-40 (Paul, 1991).

A estimulação celular com LPS, IL-1 e membros da família TNF ou a ativação de receptores de antígeno nos linfócitos são capazes de induzir a ativação de NF- κ B (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998) e atuam como sinais acessórios para as respostas mediadas por IL-4. Proteínas NF- κ B formam dímeros no citoplasma que encontram-se ligados a I κ B. Após a estimulação, as proteínas I κ B são fosforiladas e degradadas, permitindo a translocação dos complexos NF- κ B para o núcleo (Baldwin, 1996; Ghosh *et al.*, 1998).

A participação da família de fatores de transcrição NF- κ B na regulação da apoptose tem sido descrita extensamente (Beg e Baltimore, 1996; Wang *et al.*, 1996). Embora possa atuar como fator pró-apoptótico, diversos genes anti-apoptóticos podem ser regulados por NF- κ B (Wang *et al.*, 1998, Chu *et al.*, 1997) em vários tipos celulares e sistemas.

Embora tenha sido demonstrado que a IL-4 sozinha não é capaz de ativar NF- κ B, vários estudos mostram que esta citocina pode modificar (aumentar ou inibir) a ativação de NF- κ B induzida por outros agentes (Clarke *et al.*, 1995; Pindolia *et al.*, 1996).

Estudos realizados por Zamorano e colaboradores em 2001, mostram que a IL-4 aumenta a ativação de NF- κ B induzida por TNF- α em células 32D (célula parental mielóide dependente de IL-3), levando ao aumento da proteção contra apoptose. A inibição farmacológica de NF- κ B, resulta na indução da morte celular que não pode ser inibida pela IL-4, sugerindo que a IL-4 coopera com NF- κ B na proteção contra a apoptose. A IL-4 também é capaz de aumentar a ativação de NF- κ B mediada por anticorpos anti-CD3 em células T primárias e essa atividade NF- κ B é indispensável para o efeito anti-apoptótico da IL-4 (Zamorano *et al.*, 2001)

1.7.3- Funções da IL-4 no Sistema Nervoso

Estudos têm demonstrado que a IL-4 exerce função anti-inflamatória no cérebro, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 β e o TNF- α (Lee *et al.*, 1995; Mori *et al.*, 1995) e antagonizando os efeitos do IFN- γ (Fiorentino *et al.*, 1991). Experimentos realizados *in vivo* mostram ainda que a IL-4 pode regular a inflamação cerebral induzindo a morte de microglia ativada e aumentando conseqüentemente a sobrevivência neuronal (Park *et al.*, 2005).

Além disso, Mössner e colaboradores em 2001 mostraram que a IL-4 é capaz de diminuir o número de transportadores de serotonina (5-HTT) em linfócitos B

imortalizados. Essas células representam um modelo prático para o estudo do que ocorre com neurônios serotoninérgicos, visto que os efeitos do polimorfismo no RNAm para 5-HTT e na proteína 5-HTT são semelhantes em células periféricas e no cérebro humano. A ‘downregulation’ do 5-HTT reduz a quantidade de serotonina disponível para ser liberada nos sítios de inflamação. Como a serotonina faz parte da cascata inflamatória, a IL-4 exerce, então, uma ação anti-inflamatória.

Citocinas associadas a células T-helper, como a IL-4 e o IFN- γ são capazes de induzir neurogênese e oligodendrogênese de células progenitoras neurais em camundongos adultos. Microglia ativada por IL-4, por sua vez, tende a orientar-se para oligodendrogênese (Butovsky *et al.*, 2005).

A IL-4 aumenta o número de células positivas para GFAP em cultura (Araujo e Cotman, 1993), diminui a proliferação em astrócitos de humanos (Estes *et al.*, 1993, Barna *et al.*, 1995), e aumenta o efeito anti-proliferativo do TNF- α em uma linhagem celular de glioblastoma (Iwasaki *et al.*, 1993). Da mesma forma, induz um efeito bifásico na proliferação de células gliais C6, levando a um aumento da proliferação celular em baixas concentrações e inibição em altas concentrações. A inibição da proliferação celular está associada à diferenciação das células em um fenótipo de astrócito (Brodie e Goldreich, 1994).

A indução da síntese e secreção de NGF pela IL-4 também foi observada em células astrogliais de ratos (Awatsuji *et al.*, 1993), em células gliais C6 (Brodie e Goldreich, 1994) e em astrócios corticais e cerebelares de camundongos (Brodie *et al.*, 1998). Estudos desenvolvidos, *in vitro*, mostraram ainda que a IL-4 atua inibindo a liberação de agentes neurotóxicos, tais como o fator de necrose tumoral- α e o óxido nítrico (Chao *et al.*, 1993).

A IL-4 é capaz de aumentar a sobrevivência de neurônios hipocámpais de embriões de ratos mantidos em cultura por 24 e 72 horas, de forma dependente da concentração utilizada (Araujo e Cotman, 1993). Da mesma forma, já foi demonstrado que a IL-4 aumenta a sobrevivência das células ganglionares da retina em cultura e que essa sobrevivência é mediada pela atividade colinérgica através da ativação de receptores muscarínicos do tipo M1 e por células proliferantes em cultura (Sholl-Franco *et al.*, 2001).

Reforçando a hipótese de agente neuroprotetor, estudos recentes mostram que a transfecção gênica da IL-4 mediada por adenovírus (Ad.IL-4) aumenta a sobrevivência das células ganglionares da retina, 14 dias após a axotomia. Esse efeito é observado tanto na administração intraocular do vetor como na sua injeção nos colículos superiores. O Ad.IL-4 também diminuiu a imunorreatividade à nitrotirosina, sugerindo que a IL-4 protege as CGR da formação de peroxinitrito, que resulta da síntese de óxido nítrico por células gliais ativadas (Koeberle *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

► Investigar as vias de sinalização ativadas pela IL-4 capazes de aumentar a sobrevivência das CGR;

2.2. Objetivos específicos:

► Investigar o envolvimento de neurotrofinas no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela IL-4;

► Avaliar o envolvimento de células gliais da retina (células de Müller) no aumento de sobrevivência das células ganglionares (CGR) induzido pela IL-4.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1- Materiais:

A Interleucina-4 recombinante humana (IL-4) e o BDNF são provenientes da PEPROTECH (New Jersey, USA). A penicilina G, o sulfato de estreptomicina, L-glutamina, a ornitina, a peroxidase e o BAPTA foram comprados da Sigma (St. Louis, MO, USA). O Meio 199 foi comprado da Gibco (Gaithersburg, MD, USA) e a tripsina da Worthington (Freehold, NJ, USA). A nifedipina foi obtida da RBI/Sigma (Natick, MA, USA). A Brefeldina A, o PP1 e o K252a são provenientes da BIOMOL (Plymouth Meeting, PA, USA). As placas de Petri foram compradas da TPP (Switzerland).

3.2- Animais Utilizados:

Em nossos experimentos utilizamos ratos neonatos da linhagem Lister Hooded, de ambos os sexos, nas primeiras 72 horas após o nascimento (P0-P2). Os procedimentos envolvendo animais seguem as normas da Sociedade de Neurociências.

3.3- Injeção de Peroxidase para a Marcação das Células Ganglionares:

As células ganglionares da retina foram marcadas pelo transporte retrógrado de peroxidase. Nas primeiras 24h após o nascimento, os animais foram anestesiados por hipotermia e foi feita uma incisão na região occipital da cabeça. A cartilagem foi cortada com o auxílio de uma tesoura de microcirurgia e os colículos foram expostos. Ambos os colículos superiores receberam injeções de peroxidase (30% em DMSO

2%). Após um período de no mínimo 16h, os animais foram sacrificados e foi iniciado o procedimento para a obtenção das culturas.

3.4- Protocolo para Cultura de Células Mistas:

Os animais foram sacrificados por decapitação e seus olhos foram removidos e colocados em solução salina sem cálcio e sem magnésio (CMF). A seguir, suas retinas foram dissecadas e dissociadas enzimaticamente com tripsina 0,1% por aproximadamente 30 minutos a 37°C. Logo depois, as células foram trituradas mecanicamente com o auxílio de uma pipeta Pasteur de ponta afilada e plaqueadas em lamínulas de vidro tratadas previamente com 50 µg/mL de poli-L-ornitina, num volume total de 2mL em meio de cultura completo (Meio 199, 5% de soro fetal bovino, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e glutamina 2mM).

As células permaneceram aderindo nas lamínulas por um período de 4 horas na estufa, a 37°C e 5% de CO₂. A seguir, foram fixados os controles de 4 horas e as demais placas receberam os respectivos tratamentos.

3.4.1- Tratamento com IL-4 na Ausência de Soro Fetal Bovino:

Realizamos a experiência utilizando o protocolo de maneira convencional e deixamos as culturas aderindo por 6 horas. Após este período, fixamos os controles de 6 horas, retiramos o meio que banhava as células das demais placas e as lavamos uma vez com meio sem soro fetal bovino. Então, adicionamos às placas:

- a) meio sem soro,
- b) meio sem soro com IL-4,
- c) meio com soro,
- d) meio com soro e IL-4

3.4.2- Tratamento com IL-4 e BDNF:

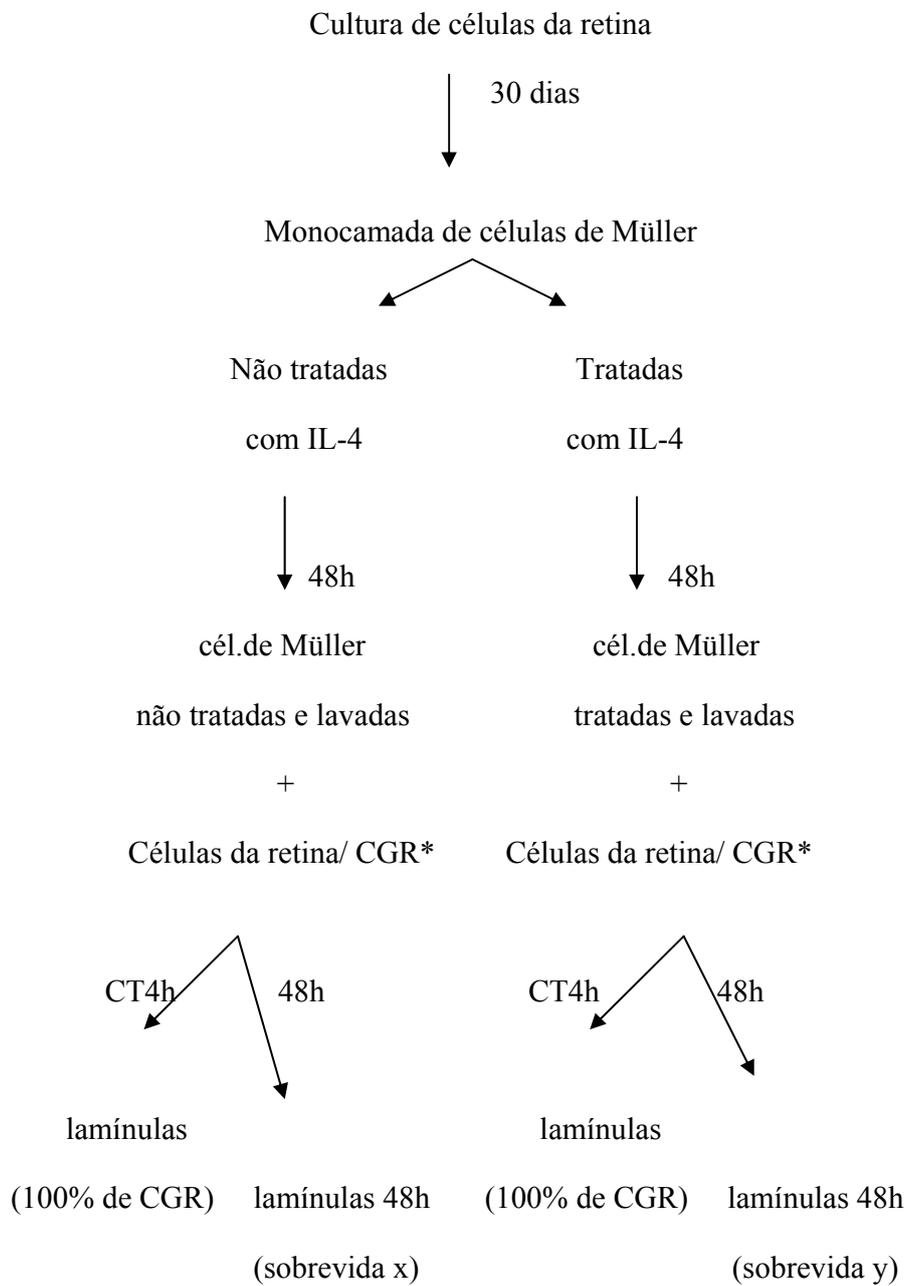
Processamos a cultura de maneira convencional. Após 4 horas fixamos os controles e adicionamos às células:

- a) meio de cultura,
- b) meio de cultura com BDNF,
- c) meio de cultura com IL-4 - tratamento por 48 horas,
- d) meio de cultura com IL-4 - tratamento por 24 horas. Após este período lavamos as placas uma vez com meio e adicionamos BDNF por mais 24 horas.

3.5- Protocolo para Cultura de Células Gliais:

Para obtenção de culturas de células de Müller em lamínulas de vidro, as células da retina de ratos foram mantidas em cultura por um prazo de aproximadamente 30 dias. Após este período, observa-se a formação de uma monocamada confluenta de células gliais e a total ausência de células neuronais. Após ter sido obtida a confluência

das células de Müller, algumas lamínulas foram tratadas por 48h com IL-4 na concentração de 5 U/mL, e outras lamínulas não receberam tratamento (lamínulas controle). Terminado este período, lavamos as culturas três vezes com meio de cultura completo e plaqueamos células da retina de animais recém nascidos sobre as células gliais, estimuladas ou não por IL-4. Após um período inicial de 4 horas, algumas lamínulas foram fixadas (controle 4h) e o número de células ganglionares presentes nessas lamínulas foi considerado o número máximo de células ganglionares plaqueadas (100%). As demais foram mantidas em estufa por 48 horas, após esse período foram fixadas e mantidas em tampão fosfato para posterior revelação da peroxidase. O volume final de meio de cultura em todas as placas foi de 2mL e as culturas foram mantidas em estufa a 37°C numa atmosfera de 5% de CO₂. Um esquema simplificado da cultura de células pode ser observado a seguir (Figura 7):



Obs.: Buscamos verificar se y é igual, maior ou menor que x.

Figura 7- Fluxograma da cultura de células da retina. CGR* = Células ganglionares da retina marcadas com peroxidase. CT= controle.

Em uma segunda etapa, realizamos experimentos buscando verificar a influência da Brefeldina A (30ng/mL), um inibidor da liberação vesicular de polipeptídeos, e do K252a (50nM), inibidor dos receptores de alta afinidade para as neurotrofinas, nos resultados obtidos. As drogas foram adicionadas concomitantemente com a IL-4 sobre as monocamadas de células gliais.

3.6- Fixação das Culturas para Revelação da Peroxidase:

As culturas foram fixadas em Karnovski (Paraformaldeído 1% e glutaraldeído 2%) por um período de 5 a 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,2-7,4.

3.7- Revelação da Peroxidase:

A revelação da peroxidase foi realizada através de uma reação histoquímica segundo o método de Mesulan (Mesulan, 1978). Foi utilizada a tetrametilbenzidina (TMB) como cromógeno e o peróxido de hidrogênio como substrato. Após a reação, as lamínulas foram desidratadas, banhadas em xilol e montadas em Entellan sobre lâminas histológicas.

A figura 8 ilustra CGRs marcadas com peroxidase, de acordo com o protocolo acima descrito.

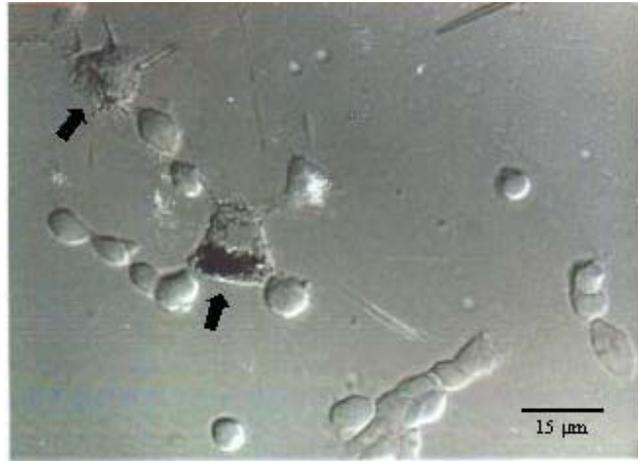


Figura 8- Fotomicrografia da cultura de células da retina de rato montadas em lamínulas sobre lâminas histológicas. A fotomicrografia foi feita em microscopia de campo claro, em um aumento de 630X. As setas indicam células ganglionares marcadas com peroxidase. Barra de calibração igual a 15μm.

3.8- Avaliação do Número de Células Ganglionares:

Utilizamos um método de contagem sistemática, em microscópio de campo claro, com um aumento de 400X. Nossos resultados foram expressos em porcentagens relativas ao controle de 4 ou 6 horas.

4. RESULTADOS

Inicialmente, buscamos verificar se o soro fetal bovino adicionado ao meio de cultura influencia no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela IL-4 (5 U/mL). Dados anteriores do laboratório mostram que o tratamento de culturas de células da retina com IL-4 por um período de 48 horas na presença do soro fetal bovino é capaz de aumentar em 100% a sobrevivência das CGR. É sabido que o soro fetal bovino apresenta diferentes citocinas que poderiam agir de forma cooperativa potenciando o efeito da IL-4. Ao plaquearmos as células em meio 199 sem soro observamos, entretanto, que não houve bloqueio do efeito da IL-4 indicando ser a IL-4 um estímulo suficiente para regular a sobrevivência desta população neuronal (Figura 9).

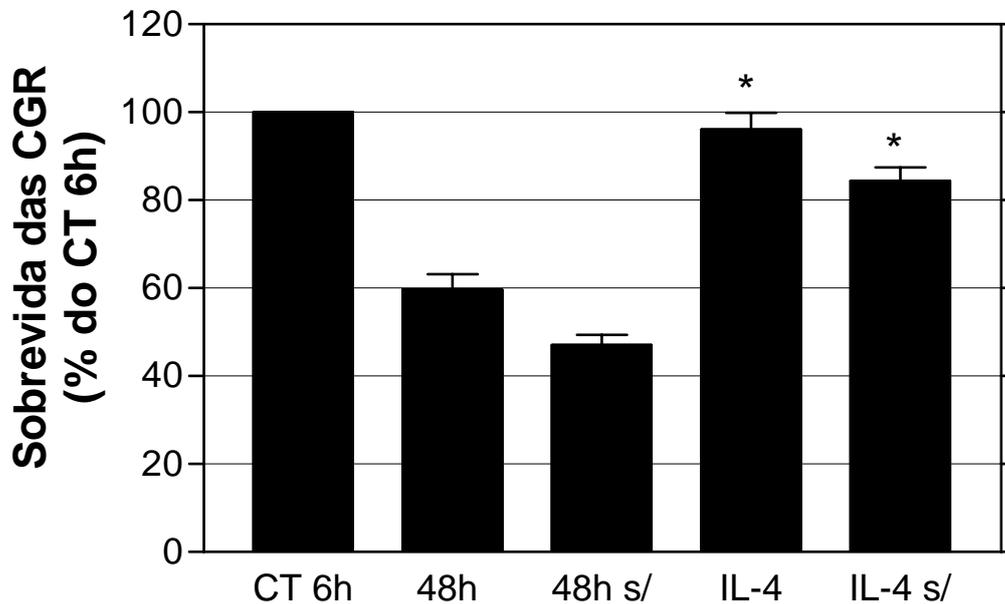


Figura 9- Efeito do soro fetal bovino no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela Interleucina-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, s/ = sem soro. Os dados estão representados como percentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 6 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Posteriormente, tratamos as culturas com IL-4 (5U/mL) por um período de 24 horas com o intuito de avaliar se era necessário manter a citocina durante todo o tempo em cultura. Observamos que quando a IL-4 esteve presente por apenas 24h o seu efeito trófico foi totalmente perdido (Figura 10).

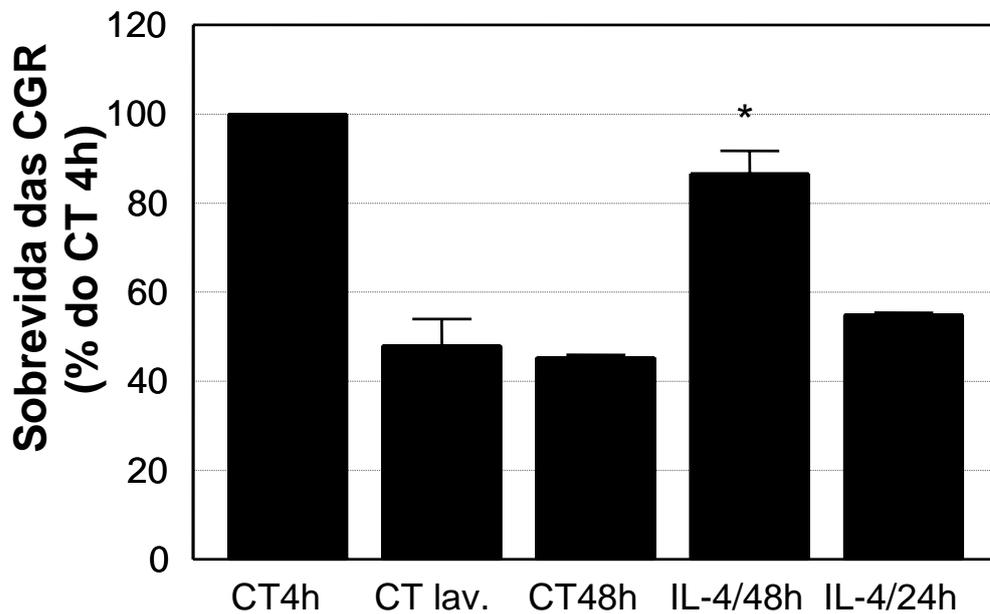


Figura 10- Um pulso de IL-4 (5U/mL) não é capaz de aumentar a sobrevivência das CGR. CT= controle, CT lav.= controle da lavagem, IL-4= Interleucina-4. Os dados estão representados como porcentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Buscando analisar a influência dos canais de cálcio do tipo L no efeito da IL-4 utilizamos um inibidor destes canais, a nifedipina (5 μ M). O tratamento com nifedipina inibiu o aumento de sobrevivência das CGR mediado pela IL-4, como evidenciado na figura 11.

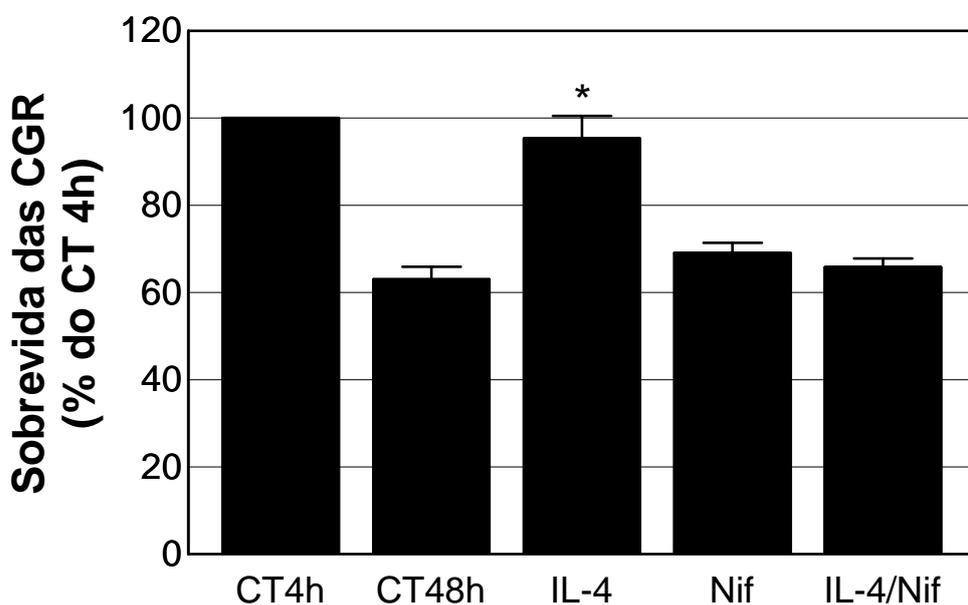


Figura 11- Efeito da nifedipina (5 μ M) no aumento de sobrevivida das CGR induzido pela IL-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, Nif= nifedipina, um bloqueador de canais de cálcio do tipo L. Os dados estão representados como percentagem da sobrevivida das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. P<0.001 comparado ao controle de 48 horas.

Dados do laboratório sugerem o envolvimento de atividade tirosina cinase no aumento de sobrevivida das CGR induzido pela IL-4. Para investigar o envolvimento de Src, família de tirosina cinases citoplasmáticas, no efeito da IL-4, utilizamos um inibidor dessas proteínas, o PP1 (1mM). Observamos, então, que a IL-4 continua aumentando a sobrevivida das CGR mesmo na presença da droga. Este resultado indica o não envolvimento destas enzimas neste fenômeno (figura 12).

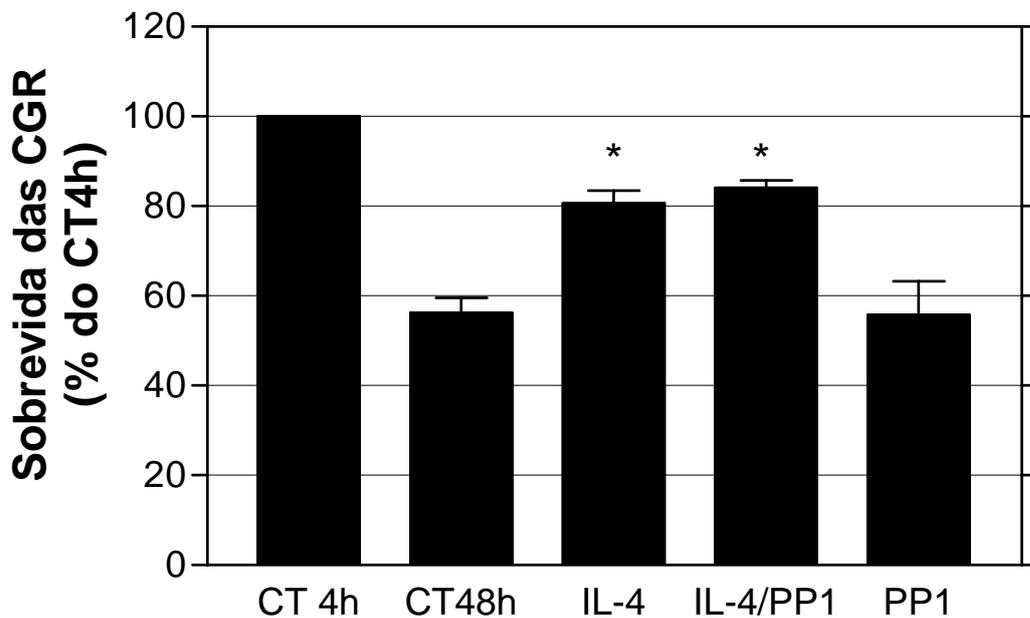


Figura 12- Efeito do PP1 (1mM) no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela IL-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, PP1= inibidor de Src. Os dados estão representados como porcentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Por outro lado, ao tratarmos as culturas com o K252a (50nM), inibidor dos receptores de alta afinidade para neurotrofinas – receptores Trk- que apresentam atividade tirosina cinase, observamos um bloqueio completo do efeito da IL-4 (figura 13).

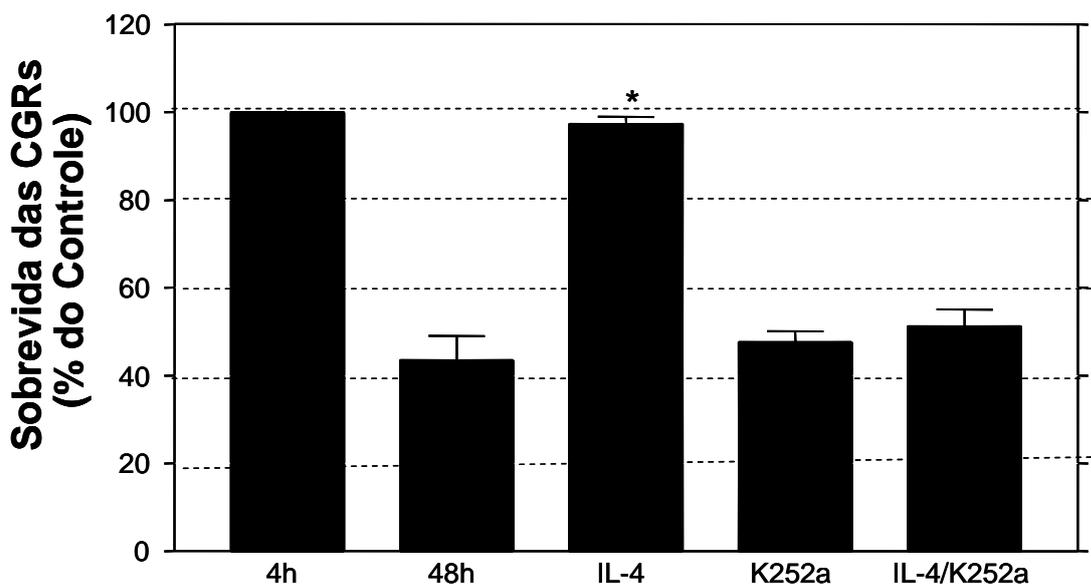


Figura 13- Efeito do K252a (50nM) no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela IL-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, K252a= inibidor de receptores Trk. Os dados estão representados como percentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Uma vez evidenciado o envolvimento de neurotrofinas no aumento de sobrevivência induzido pela IL-4 e baseados em estudos anteriores do laboratório que mostram aumento de sobrevivência mediado por BDNF, administramos IL-4 e BDNF em subdoses (0,5 U/mL e 10ng/mL, respectivamente) e verificamos uma soma dos efeitos e resgate das CGR (Figura 14).

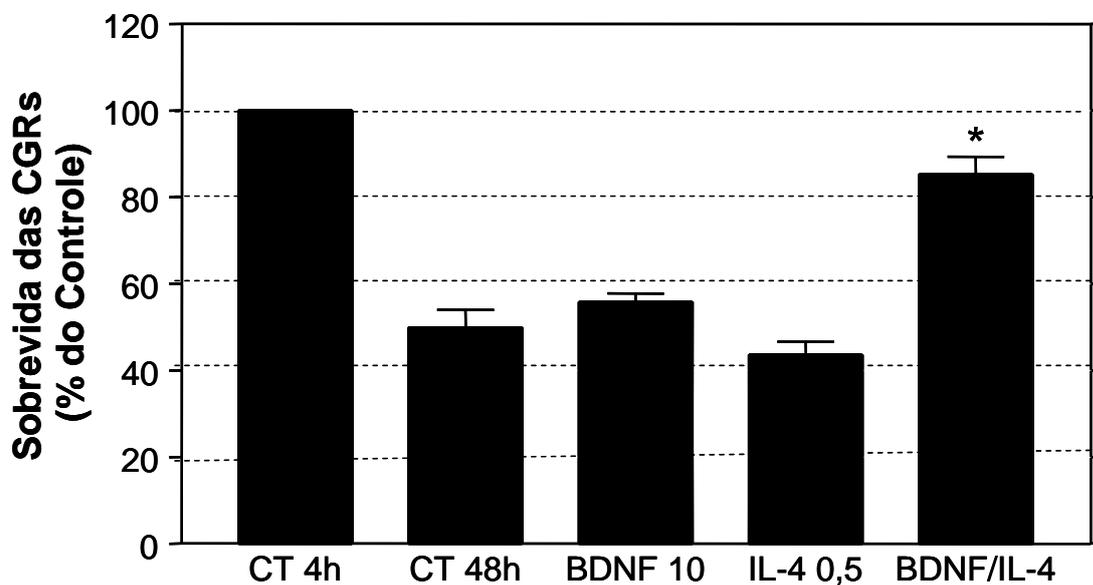


Figura 14- Efeito sinérgico da IL-4 (0,5 U/mL) e do BDNF (10ng/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro, BDNF/IL-4= BDNF e IL-4 em subdoses (10ng/mL e 0,5 U/mL, respectivamente). Os dados estão representados como percentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Acreditamos que o BDNF seja o mediador final do efeito protetor da IL-4, agindo em receptores nas CGR e aumentando a sua sobrevivência. Para confirmar essa hipótese, tratamos as células com inibidores de etapas iniciais dos eventos de sinalização, o BAPTA (20 μ M) e a Brefeldina A (30ng/mL), um quelante de cálcio intracelular e um inibidor da liberação vesicular de polipeptídeos, respectivamente. Dados anteriores do laboratório mostram que essas drogas foram capazes de bloquear

completamente o efeito da IL-4 no aumento de sobrevivência das CGR. As figuras 15 e 16 mostram que, na presença das drogas, entretanto, não há um bloqueio no efeito do BDNF (50 ng/mL) na sobrevivência das CGR.

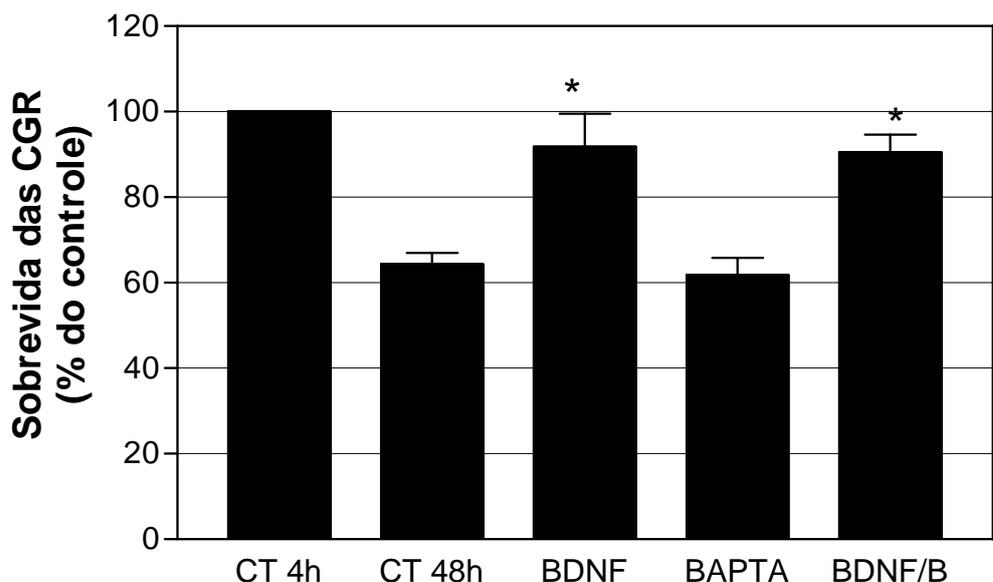


Figura 15- Efeito do BAPTA (20 μ M) no aumento de sobrevivência das CGR induzido pelo BDNF (50ng/mL). CT= controle, BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro, BAPTA= quelante de cálcio intracelular, BDNF/B= BDNF e BAPTA. Os dados estão representados como porcentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

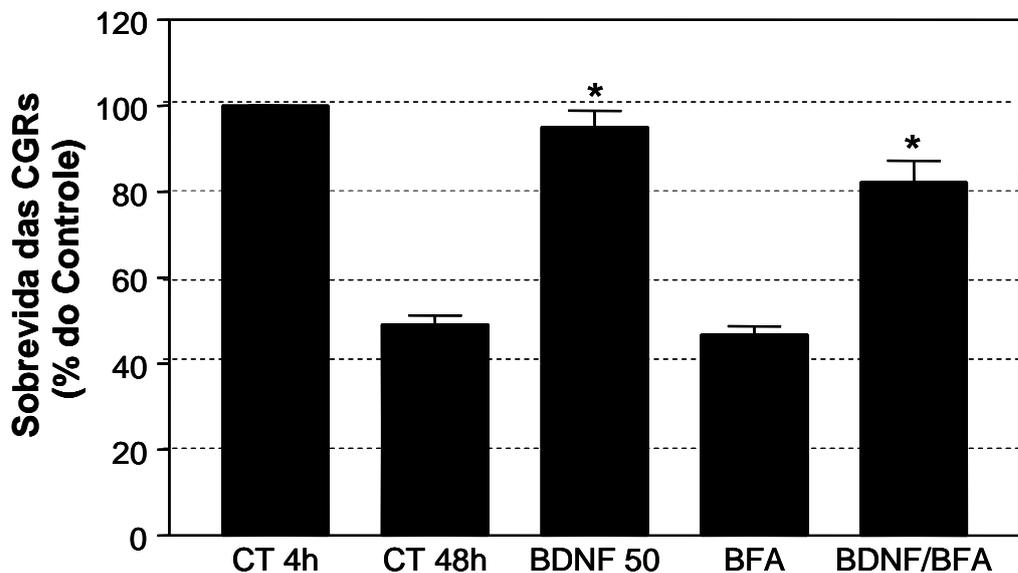


Figura 16- Efeito da Brefeldina A (30ng/mL) no aumento de sobrevivência das CGR induzido pelo BDNF (50ng/mL). CT= controle, BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro, BFA= Brefeldina A, um inibidor da liberação vesicular de polipeptídeos . Os dados estão representados como porcentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

A seguir, tratamos culturas previamente estimuladas com IL-4 por 24 horas com BDNF (50ng/mL) por igual período e observamos que não houve aumento de sobrevivência das CGR. O BDNF, portanto, não foi capaz de resgatar as CGR da morte quando administrado nas 24 horas subsequentes ao tratamento com IL-4 por curto período (Figura 17).

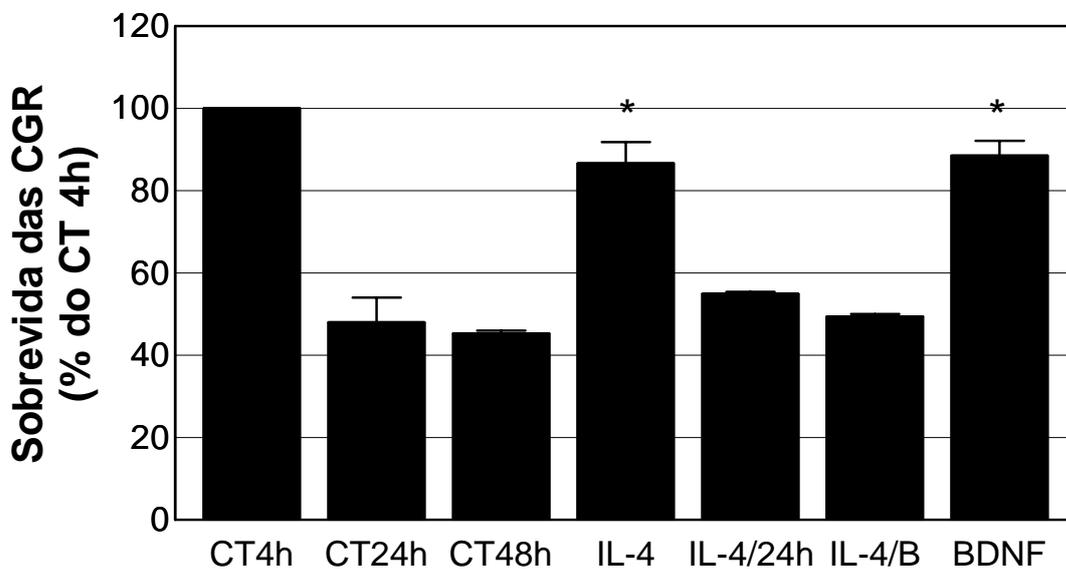


Figura 17- Efeito temporal dos tratamentos com IL-4 (5 U/mL) e BDNF (50ng/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro, IL-4/24= tratamento com IL-4 por 24h, IL-4/B= culturas previamente estimuladas por IL-4 por 24h e posteriormente tratadas com BDNF por igual período. Os dados estão representados como porcentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Em uma outra etapa de experimentos, buscamos analisar o envolvimento de células gliais da retina (células de Müller) no efeito da IL-4 na sobrevivência das células ganglionares. Inicialmente verificamos se as células de Müller estimuladas pela Interleucina-4 seriam capazes de influenciar a sobrevivência das CGR. A Figura 18 mostra que quando CGR são plaqueadas sobre monocamadas gliais não tratadas com IL-4 ocorre uma redução de aproximadamente 50% nesta população neuronal em relação ao

controle de 4h. Entretanto, o plaqueamento de CGR sobre monocamadas de células de Müller previamente tratadas com 5 U/ml de IL-4 foi capaz de induzir um aumento de aproximadamente 90% na sobrevivência das CGR.

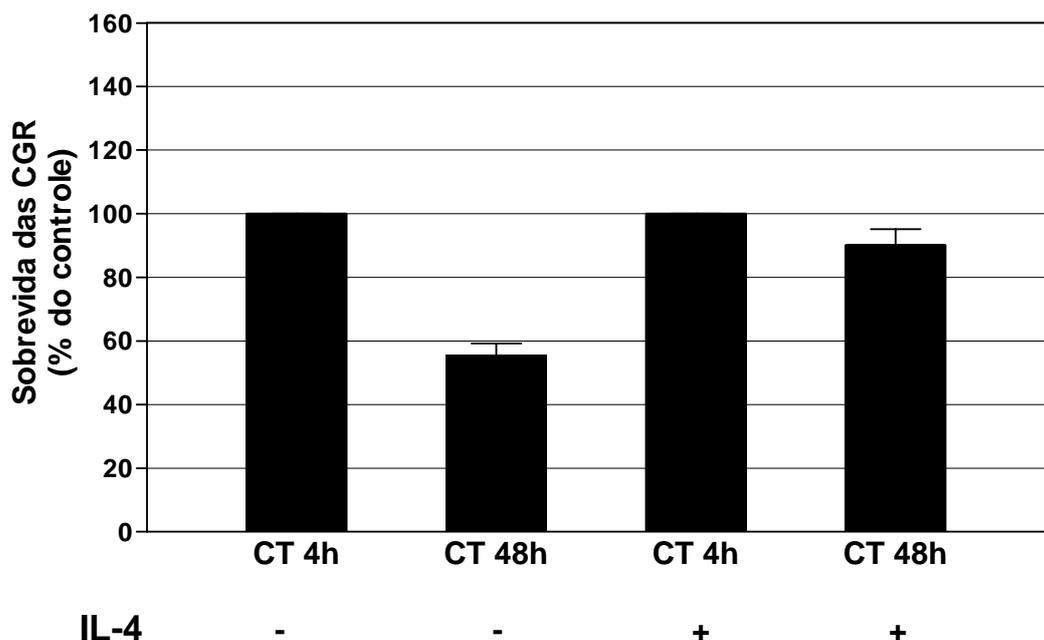


Figura 18 – Influência das células de Müller estimuladas com IL-4 (5U/mL) na sobrevivência de células ganglionares da retina. CT=controle, IL-4= Interleucina-4. Os dados estão representados como percentagem da sobrevivência das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Posteriormente, avaliamos se a Brefeldina A (BFA), um inibidor da liberação vesicular de polipeptídeos, era capaz de bloquear o efeito na sobrevivência mediado por células de Müller estimuladas com IL-4. A figura 19 mostra que células gliais tratadas

com IL-4, na presença de BFA (30ng/mL) perdiam a capacidade de aumentar a sobrevida das CGR.

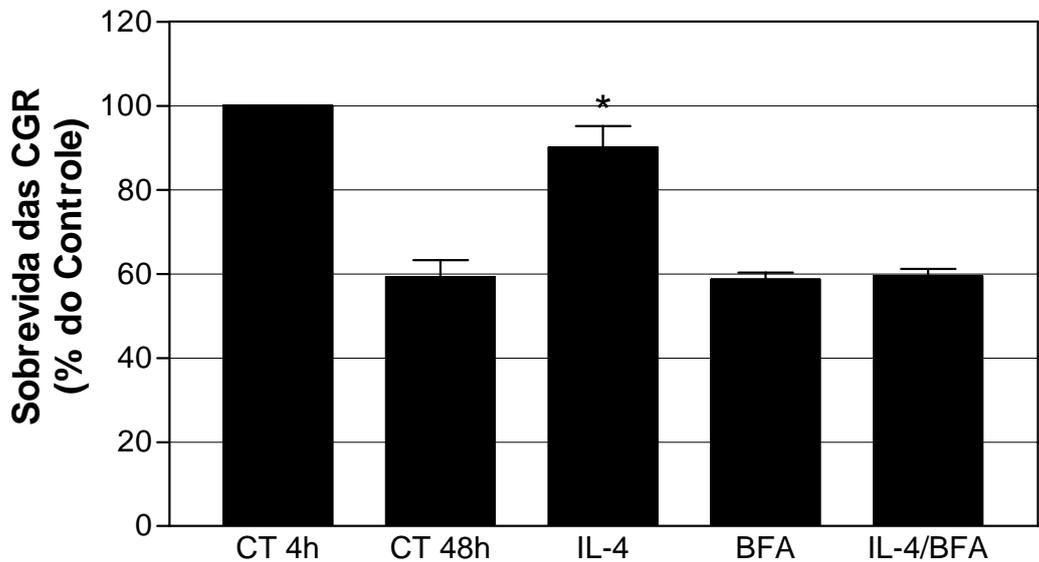


Figura 19 – Efeito da Brefeldina A (30ng/mL) no aumento de sobrevida das CGR mediado por células de Müller estimuladas com IL-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, BFA= Brefeldina A, um inibidor da liberação vesicular de polipeptídeos. Os dados estão representados como percentagem da sobrevida das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

Buscando avaliar a participação de neurotrofinas no efeito observado, tratamos as culturas com K252a (50nM), um inibidor de receptores de alta afinidade para as neurotrofinas (Trk). Esse inibidor aboliu completamente o efeito de células gliais tratadas com IL-4 no aumento da sobrevida de CGR, ou seja, foi capaz de bloquear o efeito na sobrevida mediado por células de Müller estimuladas com IL-4 (Figura 20).

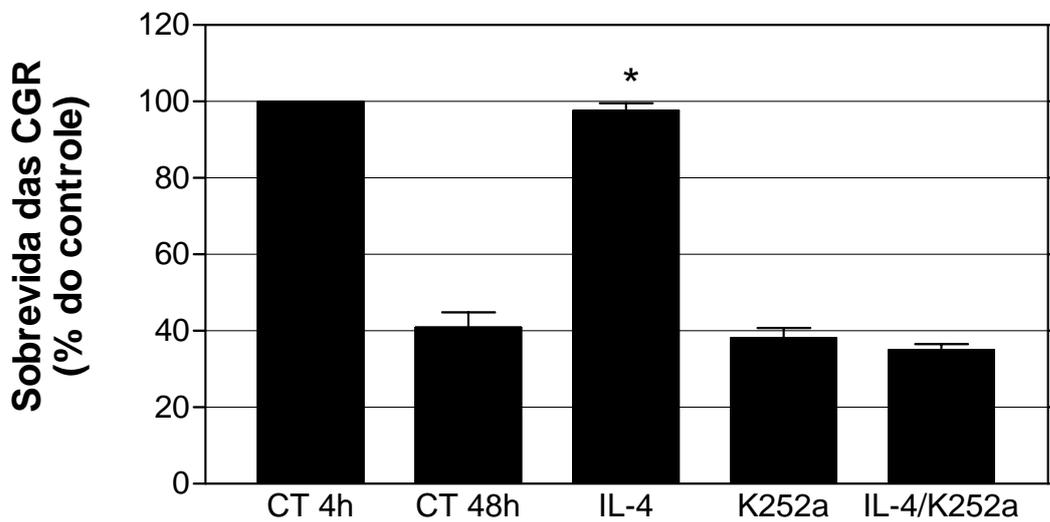


Figura 20 – Efeito do K252a (50nM) no aumento de sobrevida das CGR mediado por células de Müller estimuladas com IL-4 (5U/mL). CT= controle, IL-4= Interleucina-4, K252a= inibidor de receptores de alta afinidade para neurotrofinas. Os dados estão representados como percentagem da sobrevida das células ganglionares da retina comparado ao controle de 4 horas que representa 100% das células ganglionares plaqueadas. $P < 0.001$ comparado ao controle de 48 horas.

5. DISCUSSÃO

Além de desempenhar um importante papel na regulação do sistema imune, a IL-4 é capaz de agir no SNC, influenciando eventos de proliferação (Barna *et al.*, 1995; Estes *et al.*, 1993) e diferenciação celular (Brodie e Goldreich, 1994), sobrevivência neuronal (Araujo e Cotman, 1993; Sholl-Franco *et al.*, 2001), ramificação e modificação do fenótipo glial (Wirjatijasa *et al.*, 2002), dentre outros. Desta maneira, os estudos sobre seus efeitos durante o desenvolvimento do sistema nervoso contribuem de forma significativa para o conhecimento deste processo.

Já foi mostrado que a IL-4 desempenha um importante papel neuroprotetor no sistema nervoso. Esta citocina induz um aumento dose-dependente da sobrevivência de neurônios hipocámpais de embriões de ratos em cultura (Araujo e Cotman, 1993). Estudos recentes mostram ainda que a transfecção gênica da IL-4 mediada por adenovírus (Ad.IL-4) aumenta a sobrevivência das células ganglionares da retina após a axotomia (Koeberle *et al.*, 2004).

Dados anteriores do laboratório mostram que o tratamento de culturas de células da retina com IL-4 por 48 horas é capaz de aumentar a sobrevivência das CGR. Esse efeito é dose-dependente e envolve a ativação de receptores muscarínicos M1 e receptores 5HT-4 para serotonina. Nesses experimentos, as células foram plaqueadas em meio

199 com soro fetal bovino, o qual poderia estar influenciando nos resultados obtidos uma vez que contém diversas citocinas. Para investigar se o efeito da IL-4 ocorria mesmo na ausência de soro fetal bovino realizamos experiências em que as células foram mantidas em meio de cultura com IL-4, na presença ou na ausência de soro fetal bovino. Nossos dados, demonstraram que a presença de IL-4 é suficiente para aumentar a sobrevivência das CGR (Figura 9). Esse resultado indica que a IL-4 é capaz de regular eventos nas culturas de células da retina que levam ao aumento da sobrevivência das células ganglionares independente da adição de citocinas presentes no soro fetal bovino.

Nossos resultados demonstram o envolvimento dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L no efeito da IL-4. Dados do nosso laboratório indicam que o efeito da IL-4 depende da atividade serotoninérgica bem como da atividade colinérgica. Dados da literatura demonstram que as células colinérgicas da retina não expressam os canais do tipo L (Xu *et al.*, 2002). Isso nos leva a supor que estes canais estejam presentes nas células serotoninérgicas e estejam envolvidos com a liberação de serotonina. Estudos futuros serão necessários para analisar a possibilidade destes canais estarem presentes nas células serotoninérgicas e estarem envolvidos com a liberação deste neurotransmissor.

Proteínas que apresentam atividade tirosina cinase são capazes de desencadear a ativação de vias de sobrevivência celular. Ao investigarmos o envolvimento de algumas

dessas proteínas no efeito da IL-4, observamos que as proteínas da família Src não participam do aumento de sobrevivência induzido por esta citocina (Figura 12). O bloqueio do efeito da IL-4 ao administrarmos o K252a (Figura 13), entretanto, evidencia a dependência da ativação de receptores Trk em alguma etapa da via de sinalização que acarreta a sobrevivência das CGR. A IL-4 pode estar induzindo um aumento na liberação de neurotrofinas e/ou aumentando a expressão desses receptores na superfície celular. Futuramente avaliaremos se o tratamento com IL-4 induz um aumento na liberação de neurotrofinas ou um aumento na expressão dos receptores Trk.

Ao longo dos anos tem sido mostrado que o BDNF e seu receptor de alta afinidade, o TrkB, desempenham um importante papel na neuroproteção de células ganglionares da retina. Dados da literatura demonstram que a administração exógena de BDNF promove a sobrevivência e previne a morte após axotomia de CGR tanto *in vivo* (Mansour-Robaey *et al.*, 1994; Peinado-Ramón *et al.*, 1996) como *in vitro* (Johnson *et al.*, 1986; Thanos *et al.*, 1989). Estudos recentes mostram ainda que tanto o BDNF quanto o TrkB encontram-se presentes na camada de CGRs, como evidenciado através de métodos de análise dos níveis de RNAm (Qiao *et al.*, 1994; Jelsma *et al.*, 1993) e dos níveis de síntese protéica (Vecino *et al.*, 1998). Vecino *et al.* (2002), por sua vez, ao utilizarem técnica de imunohistoquímica e marcação retrógrada de CGR de ratos, observaram a co-expressão do BDNF e do TrkB nesse tipo celular.

Resultados anteriores do laboratório também demonstram um aumento de sobrevivência das CGR induzido pelo BDNF. Esse efeito depende da concentração utilizada, sendo obtido efeito máximo na dose de 50ng/mL. Ao utilizarmos o BDNF e a IL-4 em subdoses, houve uma somação dos efeitos e conseqüente resgate das CGR da morte (Figura 14). Esses dados sugerem que o BDNF e a IL-4 compartilhem uma mesma via de sinalização intracelular.

A nossa hipótese experimental aventa a possibilidade da IL-4 levar a uma série de eventos nas células em nossas culturas que culminariam com a liberação de BDNF e conseqüente aumento na sobrevivência das células. Se nossa hipótese estivesse correta ao adicionarmos BDNF às nossas culturas, drogas que foram capazes de inibir o efeito da IL-4, como o BAPTA e a BFA, não deveriam influenciar o efeito desta neurotrofina. Nossos resultados demonstram que o tratamento das culturas com BAPTA e BFA não bloqueou o efeito do BDNF (Figura15 e Figura16). Esses resultados, apesar de preliminares, corroboram a nossa hipótese.

Dados da literatura mostram que as células gliais são capazes de modular a sobrevivência de neurônios. Uma série de mutações em genes gliais, que inicialmente causam um mal funcionamento da glia, freqüentemente acarretam anormalidades axonais e morte neuronal, evidenciando a dependência dos neurônios em relação a essas células (Jessen, 2004).

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que o aumento de sobrevivência das CGRs induzido pela IL-4 era bloqueado pelo tratamento das culturas com fluodeoxiuridina (Fdur), um inibidor de proliferação celular. Como o principal tipo celular com capacidade de proliferação em nossas culturas são as células gliais, optamos por investigar se estas células de alguma forma influenciam o efeito da IL-4.

Nossos resultados, por sua vez, mostram que o tratamento de células de Müller com IL-4 as tornam capazes de prevenir as CGR da morte na ausência desta citocina (Figura 18). Este dado nos indica que as células gliais respondem ao tratamento com a IL-4 e a partir deste tratamento induzem direta ou indiretamente o aumento na sobrevivência das células ganglionares.

Ao tratarmos nossas culturas com Brefeldina A, observamos que as células gliais perdiam a sua capacidade de aumentar a sobrevivência das CGR (Figura 19). Este resultado sugere que a IL-4 induz a liberação de algum polipeptídeo ou a exposição de algum receptor de membrana responsável pelo aumento de sobrevivência das células ganglionares.

Dados da literatura mostram que as CGR competem por quantidades limitadas de fatores tróficos para a sua sobrevivência (Oppenheim, 1991). As células gliais, por sua vez, são capazes de liberar moléculas tróficas indispensáveis à sobrevivência dos

neurônios. Em camundongos, a perda de células gliais (células de Schwann) é acompanhada da morte de grande número de neurônios motores e neurônios do gânglio da raiz dorsal, sugerindo que estas células dependem de sinais de sobrevivência enviados pela glia (Jessen, 2004).

A inibição dos receptores Trk presentes nas células de Müller (Oku *et al.*, 2002), obtida através do tratamento com K252a concomitantemente ao tratamento com a IL-4, acarretou o bloqueio do efeito da IL-4 (Figura 20), mostrando o envolvimento de neurotrofinas no aumento de sobrevivência das CGR induzido por esta citocina.

Nossos resultados sugerem, portanto, que a IL-4, a partir da ativação de seus receptores nas células de Müller, possa estimular a liberação de moléculas ou a expressão de receptores por estas células. Pode estar ocorrendo um efeito autócrino de neurotrofinas nas células gliais ou um aumento da responsividade destas células às moléculas tróficas. Acreditamos que as células gliais modificadas pela IL-4 liberem moléculas tróficas que, por sua vez, atuem nas CGR aumentando a sua sobrevivência e que provavelmente o fator envolvido seja o BDNF. A Figura 21 representa um modelo hipotético do mecanismo responsável pelo aumento de sobrevivência das CGR induzido por células de Müller estimuladas com IL-4.

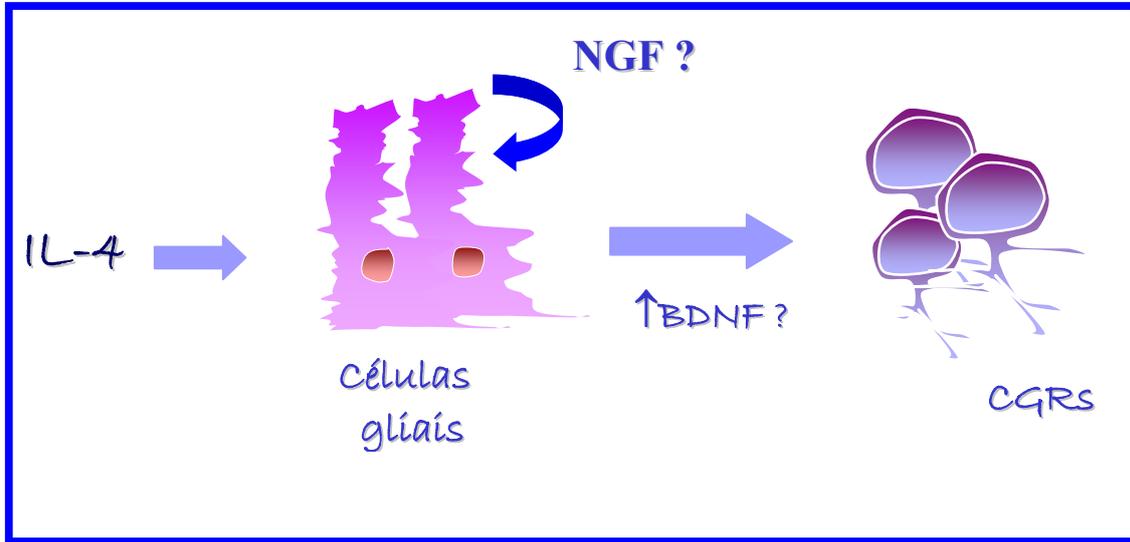


Figura 21- Ilustração do efeito da IL-4 nas células gliais e aumento da sobrevivência das células ganglionares da retina. IL-4= Interleucina-4, NGF= Fator de crescimento do nervo, BDNF= Fator neurotrófico derivado do cérebro, CGR= células ganglionares da retina.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que:

- ▶ O soro fetal bovino presente em nossas culturas não influencia no aumento de sobrevivência das CGR induzido pela IL-4.
- ▶ O tratamento das culturas com IL-4 por 24 horas não é suficiente para aumentar a sobrevivência das CGR.
- ▶ Há envolvimento de canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L no efeito da IL-4.
- ▶ Proteínas tirosina cinase da família das Src não estão envolvidas no efeito da IL-4.
- ▶ O efeito da IL-4 depende da ativação de receptores de alta afinidade para neurotrofinas.
- ▶ O tratamento com IL-4 e BDNF em subdoses induz uma soma dos efeitos e aumento de sobrevivência das CGR, evidenciando um compartilhamento de uma via de sinalização comum.

- ▶ O BDNF encontra-se ‘downstream’ na via de sinalização, uma vez que o BAPTA e a BFA não bloqueiam o aumento de sobrevivência mediado por essa neurotrofina.

- ▶ O tratamento com BDNF nas 24 horas subsequentes ao tratamento com IL-4 por igual período não é capaz de aumentar a sobrevivência das CGR.

- ▶ O efeito da IL-4 no aumento de sobrevivência das CGR é mediado por células de Müller.

- ▶ A IL-4 pode estar induzindo um efeito autócrino de neurotrofinas nas células gliais ou aumentando a responsividade dessas células às neurotrofinas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- ▶ Continuar investigando as vias de sinalização estimuladas pela IL-4 para aumentar a sobrevivência das células ganglionares de retina.

- ▶ Analisar os níveis de IL-4 na cultura e no tecido retiniano ao longo do desenvolvimento, através da técnica de Western Blotting.

- ▶ Analisar o efeito do meio condicionado de células gliais estimuladas ou não com IL-4 na sobrevivência das CGR.

- ▶ Analisar os níveis de BDNF no sobrenadante das culturas de células da retina.

- ▶ Analisar se o tratamento com a IL-4 induz um aumento dos níveis de BDNF em culturas de células de Müller e se este possível efeito ocorre em função do desenvolvimento do tecido.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUAYO, A.J.; CLARKE, D.B.; JELSMA, T.N.; KITTLEROVÁ, P.; FRIEDMAN, H.C.; BRAY, G.M. Effects of neurotrophins on the survival and regrowth of injured retinal neurons. *Ciba Found. Symp.*, v. 196, pp. 135-144, 1996.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Sinalização por meio de receptores de superfície celular associados a enzimas. *Biologia molecular da célula*, 4^a ed., 871-892, 2004.

AMARANTE-MENDES, G.P. AND GREEN, D.R. The regulation of apoptotic cell death. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.32, 1035-1061, 1999.

ARAI, K. -I.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKODA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev Biochem.*, v. 59, pp. 783-836, 1990.

ARAÚJO, D.M.; COTMAN, C.W. Trophic effects of interleukin-4, -7 and -8 on hippocampal neuronal cultures: potential involvement of glial-derived factors. *Brain Res.*, v. 600 (1), pp. 49-55, 1993.

ARAUJO, E.G.; LINDEN, R. Trophic factors produced by retinal cells increase the survival of retinal ganglion cells “in vitro”. *Eur. J. of Neurosci., in press, 1993.*

ARMSON, P. F.; BENNETT, M. R.; RAJU, T. R. Retinal ganglion cell survival and neurite regeneration requirements: the changes from Muller cell dependence to superior colliculli dependence during development. *Dev. Brain Res., v. 32, pp. 207-216, 1987.*

ARY-PIRES, R.; NAKATANI, M.; REHEN, S.K.; LINDEN, R. Developmentally regulated release of intraretinal neurotrophic factors *in vitro*. *Int. J. Dev. Neurosci., v. 15, pp. 238-255, 1997.*

AULD, D. S.; ROBITAILLE, R. Glial cells and neurotransmission: An inclusive view of synaptic function. *Neuron, v. 40, 389-400, 2003.*

AWATSUJI, H.; FURUKAWA, Y.; HIROTA, M.; MURAKAMI, Y.; NII, S.; FURUKAWA, S.; HAYASHI, K. Interleukin-4 and – 5 as modulators of nerve growth factor synthesis/secretion in astrocytes. *J. Neurosc. Res., v.34, 539-545, 1993.*

BAILEY, D.P. et al. Interleukin-4 elicits apoptosis of developing mast cells via a Stat6-dependent mitochondrial pathway. *Experimental hematology, v.32, 52-59, 2004.*

BALDWIN, A.S. Jr. The NF- κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.*, v.14, 649, 1996.

BANCHEREAU, J.; BRIÈRE, F.; GALIZZI, J.P.; MIOSSEC, P.; ROUSSET, F.
Human interleukin-4. *J. Lipid Mediators and Cell Sig.*, v. 9, pp. 43-53, 1994.

BANKER, G. A. Trophic interactions between astroglial cells and hippocampal neurons in culture. *Science*, 209, 809-810, 1980.

BÄR, P. R. Apoptosis – The cell's silent exit. *Life Sci.*, v. 59, pp. 369-378, 1996

BARBACID, M. The trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.*, v. 25, pp. 1386 - 1403, 1994.

BARDE, Y. What, if anything, is a neurotrophic factor? *Trends Neurosci.*, v. 11, pp. 343- 346, 1988.

**BARNA, B.P.; ESTES, M.L.; PETTAY, J.; IWASAKI, K.; ZHOU, P.;
BARNETT, G.H.** Human astrocyte growth regulation: interleukin-4 sensitivity and receptor expression. *J. Neuroimmunol.*, v.60, 75-81, 1995.

BEG, A.A.; BATIMORE, D. An essential role for NF- κ B in preventing TNF- α -induced cell death. *Science*, v.271, 782, 1996.

BERKEMEIER, L. R.; WINSLOW, J. W.; KAPLANN, D. R.; NICOLICS, K.; GOEDEL, D. V.; ROSENTHAL, A. Neurotrophin - 5: a novel neurotrophic factor that activates trk and trkB. *Neuron*, v. 7, pp. 857 - 866, 1991.

BOWEN, I. D. Apoptosis or programmed cell death? *Cell Biol. Intern.*, v. 17, pp. 365 - 380, 1993.

BRODIE, C.; GOLDREICH, N. Interleukin-4 modulates the proliferation and differentiation of glial cell. *Journal of Neuroimmunology*, v.55, 91-97, 1994.

BRODIE, C.; GOLDREICH, N.; HAIMAN, T.; KAZIMIRSKY, G. Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocytes activation and induces NGF secretion. *J. Neuroimmunol.*, v. 81, pp. 20-30, 1998.

BUTOVSKY, O; ZIV, Y.; SCHWARTZ, A.; LANDA G.; TALPALAR, E.A.; PLUCHINO, S.; MARTINO, G.; SCHWARTZ, M. Microglia activated by IL-4 and IFN- γ differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, v.31, 149-160, 2005.

CARMIGNOTO, G.; MAFFEI, L.; CANDEO, P.; CANELLA, R.; COMELLI, M.C. Effect of NGF on the survival of rat retinal ganglion cells following optic nerve section. *J. Neurosci.*, v. 9, pp. 1263-1272, 1989.

CARTER D.A.; AGUAYO, A.J.; BRAY, G.M. Retinal ganglion cell terminals in the hamster superior colliculus: an ultrastructural study. *J. Comp. Neurol.*, v.311, 97-107, 1991.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. *Biomed. & Pharmacother.*, v. 48, pp. 445-453, 1994.

CEPKO, C. L. Retinal cell fate determination. *Prog. In: Progress in neural research. Pergamon Press, Retinal Res.*, v.12, pp. 1-12, 1993.

CEPKO, C. L.; DYER, M. A. Regulating proliferation during retinal development. *Neuroscience*, vol. 2, pp. 333-342, 2001.

CHAO, C. C.; MOLITOR, T. W.; HU, S. Neuroprotective role of IL-4 against activated microglia. *J. Immunology*, v. 161, pp. 1473-1481, 1993.

CHAO, M. V. The p75 neurotrophin factor. *J. Neurobiol.*, v. 25, pp. 1373 - 1385, 1994.

CHU, Z.L.; MCKINSEY, T.A.; LIU, L.; GENTRY, J.J.; MALIM M.H.; BALLARD, D.W. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IA2 is under NF- κ B control. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v.94, 10057, 1997.

CLARKE, C.J.P.; TAYLOR-FISHWICK, D.A.; HALES, A.; CHERNAJOVSKY, Y.; SAGAMURA, K.; FELDMANN, M.; FOXWEL, B.M.J. Interleukin-4 inhibits κ light chain expression and NF- κ B activation but not I κ B α degradation in 70Z/3 murine pre-B cells. *Eur. J. Immunol.*, v.25, 2961-2969, 1995.

COFFMAN, R.L.; OHARA, J.; BOND, M.W.; CARTY, J.; ZLOTNICK, A.; PAUL, W.E. B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.*, v.136, 4538, 1986.

COHEN, A.; BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. Neurotrophin 4/5 (NT-4/5) increases adult rat retinal ganglion cell survival and neurite outgrowth *in vitro*. *J. Neurobiol.*, v. 25, pp. 953-959, 1994.

COHEN, S.; LEVI - MONTALCINI, R.; HAMBURGER, V. A nerve growth-stimulating factor isolated from snake venom. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 40, pp. 1014 - 1018, 1954.

COWAN, W. M. Selection and control in neurogenesis. *The Neuroscience 4th Study Program*. Cambridge: MIT Press, 1979.

COWBURN, R. F.; FOWLER, C. J.; O'NEIL, C. Neurotransmitters, signal transduction and second-messengers in Alzheimer's disease. *Acta. Neurol. Scand.*, v. 165, pp. 25 - 32, 1996.

CUI, Q.; HARVEY, A.R. NT-4/5 reduces naturally occurring retinal ganglion cell death in neonatal rats. *Neuro Report.*, v. 5, pp.1882-1884, 1994.

DAVIS, A. M. Neurotrophic factors - switching neurotrophin dependence. *Curr. Biol.*, v. 4, pp. 273 - 276, 1994a.

DAVIS, A. M. Neurobiology - tracking neurotrophin function. *Nature.*, v. 368, pp.193- 194, 1994b.

DOWLING, J. E. Retina. *Enc. Human Biol.*, v. 6, pp. 615-631, 1991.

DUSCHL, A.; SEBALD, W. Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond. *Eur. Cytokine Netw.*, v. 7, pp. 37-49, 1996.

EBENDAL, T. Function and evolution in the NGF family and its receptors., *J. Neurosci. Res.*, v. 32, pp. 461-470, 1992.

EHRlich, D.; KEYSER, K.; MANTHORPE, M.; VARON, S.; KARTEN, H.J. Differential effects of axotomy on substance P-containing retinal ganglion cells: time course of degeneration and effects of nerve growth factor. *Neurosci.*, v. 36, pp. 699-723, 1990.

ERNFORS, P.; WETMORE, C.; OSLO, L.; PERSON, H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron.*, v. 5, pp. 511 - 526, 1990.

ESTES, M.I.; IWASAKI, K.; JACOBS, B.S.; BARNA, B.P. Interleukin-4 down-regulates adult human astrocytes DNA synthesis and proliferation. *Am. J. Pathol.*, v.143, 337-341, 1993.

EVANS, V. G. Multiple pathways to apoptosis. *Cell Biol. Intern.*, v. 17, 461 - 476, 1993.

FARBER, D.; ADLER, R. Issues and questions in cell biology of the retina. In Farber, D. and Adler, R. (eds): The Retina. A model for Cell Biology Studies. Part I. *Academic Press Inc. (London) Ltd.*, pp. 2 - 16, 1986.

FARRAR, J.J.; HOWARD, M.; FULLER-FARRAR, J.; PAUL, W.E. Biochemical and physiochemical characterization of a mouse B cell growth factor: a lymphokine distinct from interleukin-2. *J. Immunol.*, v. 131, pp. 1838-1842, 1983.

FERGUSON, S.S.G. Receptor tyrosine kinase transactivation: fine-tuning synaptic transmission. *Trends in neurosciences*, v.26, 119-122, 2003.

FIELDS, R.D. A outra metade do cérebro. *Scientific American*, ano 2, n° 24, pp 46-53, 2004.

FINNEY, M.J.; GUY, G.; MICHELL, R.H.; GORDON, J.; DUGAS, B.; RIGLEY K.P.; CALLARD, R.E. Interleukin 4 activates human B lymphocytes via transient inositol phospholipid hydrolysis and delayed cyclic adenosine monophosphate generation. *Eur. J Immunol*, v.20, 151-156, 1990.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWANR, M.; O'HARA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, v.147, 3815-3822, 1991.

FOOTE, L.C.; HOWARD, R.G.; MARSHAK- ROTHSTEIN, A.; ROTHSTEIN, T.L. IL-4 induces Fas resistance in B cells. *J. Immunol.*, v.157, 2749, 1996.

GALIZZI, J.-P.; ZUBER, C.E.; HARADA, N.; GORMAN, D.M.; DLOSSOU, O.; KASTELEIN, R.; BANCHEREAU, J.; HOWARD, M.; MIYAJIMA, A. Molecular cloning of a cDNA encoding the human interleukin-4 receptor. *Int. Immunol.*, v. 2, pp. 669-675, 1990.

GÄRTNER, A.; SHOSTAK, Y.; HACKEL, N.; ETHELL, I. M. Ultrastructural identification of storage compartments and localization of activity-dependent secretion of neurotrophin-6 in hippocampal neurons. *MCN*, v. 15, pp. 215-234, 2000.

GHOSH, S.; MAY, M.J.; KOPP, E.B. NF- κ B and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, v.16, 225, 1998.

HALLBÖÖK, F.; IBÁÑEZ, C. F.; PERSON, H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *xenopus* ovary. *Neuron.*, v. 6, pp. 845 - 858, 1991.

HAMBURGER, V.; OPPENHEIM, R. W. Naturally occurring neuronal death in vertebrates. *Neurosci. Comment.*, v. 1, pp. 39 - 55, 1982.

HEANEY, M. L.; GOLDE, D. W. Soluble hormone receptors., *Blood.*, v. 82, pp. 1945-1948, 1993.

HERTZ, L.; GIBBS, M. E. O'DOWD, B. S.; SEDMAN, G.L.; ROBINSON, S. R.; PENG, L. Astrocytes-neuron interaction during one-trial aversive learning in the neonate chick. *Neurosci Biobehav. Rev*, v.20, 537-551, 1996.

HOLTMANN, H.; RESCH, K. Cytokines. *Naturwissenschaften.*, v. 82, pp. 178-187, 1995.

HOPKINGS, S. J.; ROTHWELL, N. J. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition., *Trends Neurosci.*, v. 18, pp. 83-88, 1995.

HOU, J.; SCHINDLER, U.; HENZEL, W.J.; HO, T.C.; BRASSEUR, M.; MCNIGHT, S.L. An interleukin-4 induced transcription factor: Stat6. *Science*, v.265, 1701, 1994.

HYDEN, H. A. A two-cell collaboration responsible for brain activity. *Acta Univ Gothoburgensis*, v.66, 1-26, 1960.

IBÁÑEZ, C. F. Jekyll-hyde neurotrophins: the story of pro-NGF. *TRENDS Neurosci.*, v. 25, pp. 284-286, 2002.

IWASAKI, K.; ROGERS, L.R.; ESTES, M.L.; BARNA, B.P. Modulation of proliferation and antigen expression of a clonal human glioblastoma by Interleukin-4 alone and in combination with tumor necrosis factor- α and/m or Interferon- gamma. *Neurosurgery*, v.33, 489-494, 1993.

JELSMA, T. N.; FRIEDMAN, H. H.; BERKELAAR, M.; BRAY, G. M.; and AGUAYO, A. J. Different forms of the neurotrophin receptor Trk B mRNA predominate in rat retina and optic nerve. *J. Neurobiol.*, v. 24, pp. 1207-1214, 1993.

JESSEN, K. R.; Glial cells. *The Int. J. of Biochemistry and cell biol.*, v.36, pp. 1861-1867, 2004.

JOHNSON, J. E.; BARDE, Y. A.; SCHWAB, M.; THOENEN, H. Brain derived neurotrophic factor supports the survival of cultured rat ganglion cells. *J. Neurosci.*, v. 6, pp. 3031-3038, 1986.

KAPLAN, M.H.; SCHINDLER, U.; SMILEY S.T.; GRUSBY, M.J. Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells. *Immunity*, v.4, 313-319, 1996.

KAPLAN, D.R. and MILLER, F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v.10, 381-391, 2000.

KEEGAN, A.D.; PIERCE, J.H. The interleukin-4 receptor: signal transduction by a hematoin receptor. *J. Leucocyte.*, v. 55, pp. 272-279, 1994.

KERR, J. F. R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, v. 27, 471-474, 2002.

KETTENMANN H.; RANSOM, B. R. Neuroglia. *New York: Oxford University Press, 1995.*

KITTELEROVÁ, P.; BRAY, G. M.; AGUAYO, A. J. TrKC expression in intact and injured adult retinas. *Soc. Neurosci. Abstr.*, v. 21, p. 1550, 1995.

KNUSEL, B.; GAO, H. Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons. *L. Sci.*, v. 58, n^o22, pp. 2019 - 2027, 1996.

KOEBERLE, P.D.; GAULDIE, J., BALL, A.K. Effects of adenoviral- mediated gene transfer of interleukin-10, interleukin-4 and transforming growth factor-beta on the survival of axotomized retinal ganglion cells. *Neuroscience*, v.125, 903-920, 2004.

KOLB, H. The architecture of functional neural circuits in the vertebrate retina - The proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, v. 35, pp. 2385 - 2404, 1994.

KORSHING, S. The neurotrophic factor concept: a reexamination., *J. Neurosci.*, v. 13, pp. 2739-2748, 1993.

KORSMEYER, S.J. Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect*, v.95, 21-41, 1999.

KOTECHA, S.A. et al. A D2 class dopamine receptor transactivates a receptor tyrosine kinase to inhibit NMDA receptor transmission. *Neuron*, v.35, 1111-1122, 2002.

LAPORT, S.L.; FORSYTH, C.M.; CUNNINGHAM, B.C.; MIERCKE, L.J.; AKHAVAN, D.; STROUD, R.M. De novo design of an IL-4 antagonist and its structure at 1.9 Å. *PNAS*, v.102, 1889-1894, 2005.

LEE, J.D.; RHOADES, K.; ECONOMOU, J.S. Interleukin-4 inhibits the expression of tumor necrosis factor alpha and beta, interleukins-1 beta and -6 and interferon-gamma. *Immunology and Cell Biology*, v.73, 57-61, 1995.

LEIBROCK, J.; LOTTSPREICH, F.; HOHN, A.; HOFER, M.; HENGERER, B.; MASIAKOWSKI, P.; THOENEN, H.; BARDE, Y. A. Molecular cloning expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature.*, v. 341, pp. 149 - 152, 1989.

LEONARD, W.J.; O'SHEA, J.J. Jaks and STATs: biological implications. *Annu. Rev. Immunol.*, v.16, 29, 1998.

LEVI-MONTALTINI, R.; HAMBURGER, V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of chick embryo. *J. Exp. Zool.*, v. 116, pp. 321-361, 1951.

LINDEN, R. and PERRY, V.H. Ganglion cell death within the developing retina: a regulatory role for retina dendrites? *Neurosci.*, v.11, 2813-2827, 1982.

LOCKSLEY, R. M. Cytokines – general properties. *Biol. Parasitism*, pp. 1-8, 1991.

LOVETT-RACKE, A.; SMITH, M. E.; ARREDONDO, L. R.; BITTNER, P. S.; RATTS, R. B.; SHIVE, C. L.; FORSTHUBER, T. G.; RACKE, M. K. Developmentally regulated gene expression of TH2 cytokines in the brain. *Brain res.*, v. 870, pp. 27-35, 2000.

MANSOUR-ROBAEY, S.; CLARKE, D.B.; WANG, Y.C.; BRAY, G.M.; AGUAYO, A.J. Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, v.91, 1632-1636, 1994.

MATTSON, M. P.; FURUKAWA, K. Programmed cell life: anti-apoptotic signaling and therapeutic strategies for neurodegenerative disorders. *Res. Neurol. Neurosci.*, v. 9, pp. 191 - 205, 1996.

McCAFFERY, C. A.; BENNETT, M. R.; DREHER, B. The survival of neonatal rat retinal ganglion cells “in vitro” is enhanced in the presence of appropriate parts of the brain. *Exp. Brain Res.*, v. 48, pp. 377 - 386, 1982.

MCKAY C.E.; CUSHLEY, W. Induction of Cd25 expression in human B lymphocytes by pharmacological mimetics of signaling pathways. *Cytokine*, v.8, 305-312, 1996.

MCKAY C.E.; HEWITT, E.L.; OZANNE, B.W.; CUSHLEY, W. A functional role for interleukin (IL)-4-driven cyclic AMP accumulation in human B lymphocytes. *Cytokine*, v. 12, 731-736, 2000.

MESULAN, M.M. Tracing neural connections with horseradish peroxidase. John Wiley and Sons. *New York*, 251, 1978.

MILLER, F. D.; KAPLAN, D. R. Life and death decisions: a biological role for the p75 neurotrophin receptor. *Cell Death and Differentiation*, v. 5, pp. 343-345, 1998.

MILOUX B.; LAURENT, P.; BONNIN, O.; LUPKER, J.; CAPUT, D.; VITA, N.; FERRARA, P. Cloning of the human IL-13R alpha 1 chain and reconstitution with the IL-4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex. *FEBS Lett.*, v.401, 163, 1997.

MORI, N.; SHIRAKAWA, F.; MURAKAMI, S.; ODA, S.; ETO, S. Interleukin-4 inhibits the production of interleukin-1 by adult T-cell leukemia cells. *European Journal of Hematology*, v.55, 121-125, 1995.

MÖSSNER, R.; DANIEL, S.; SCHMITT, A.; ALBERT, D.; LESH, KP. Modulation of serotonin transporter function by interleukin-4. *Life science*, v.68, 873-888, 2001.

MUELLER, T.D.; ZHANG, JL.; SEBALD, W.; DUSCHL, A. Structure, binding, and antagonists in the IL-4/IL-13 receptor system. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1592, 237-250, 2002.

NEWMAN, E.; REICHENBACH, A. The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.*, v. 19, pp. 307-312, 1996.

OKU, H.; IKEDA,T.; HONMA, Y.; SOTOZONO, C.; NESHIDA, K.; NAKAMURA, Y.; KIDA T.; KINOSHITA, S. Gene expression of neurotrophins and their high- affinity Trk receptors in cultured human Müller cells. *Ophthalmic Res.*, v.34, 38-42, 2002.

OPPENHEIM, R. W. Neuronal cell death and some related regressive phenomena during neurogenesis. A selective historical review and progress report. In: Cowan, W. M. (ed): *Studies in Developmental Neurobiology. Essay in Honor of Victor Hamburger*, NY: Oxford Univ. Press., pp. 74 - 133, 1981.

OPPENHEIM, R. W. Cell death during development of the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 14, pp. 453 - 501, 1991.

OPPENHEIM, R. W. Programmed Cell Death. *Fundamental neuroscience – Zigmond, et al. Academic Press*, pp. 581-609, 1999.

OSLON, L.; BÄCKMAN, L.; EBENDAL, T.; JÖNHAGEN, M. E.; HOFFER, B.; HUMPEL, C.; FREEDMAN, R.; GRACOBINI, M.; MEYERSON, B.; NORDBERG, A.; SEIGER, A.; STRÖMBERG, I.; SYDOW, O.; TOMAE, A.; TROC, K.; WINBLAD, B. Role of growth factors in degeneration and regeneration

in the central nervous system; clinical experiences with NGF in Parkinson's and Alzheimer's diseases. *J. Neurol.*, v. 241, pp. 12 - 15, 1994.

PARK, K.W.; LEE, D.Y. JOE, E.H.; KIM, S.U.; JIN, B.K. Neuroprotective role of microglia expressing interleukin-4. *J. Neurosci. Res*, v.81, 397-402, 2005.

PASTI, L.; VOLTERRA, A.; POZZAN, T.; CARMIGNOTO, G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.*, v. 17, pp. 7817-7830, 1997.

PATTERSON, P. H. Cytokines and the function of the mature nervous system. *C. R. Acad. Sci. Paris*, v. 316, pp. 1150-1157, 1993.

PAUL, W.E. Interleukin 4: a prototypic immunoregulatory lymphokine. *Blood*, v.77, 1859-1872, 1991.

PEINADO-RAMÓN, P.; SALVADOR, M.; VILLEGAS, M.P.; VIDAL-SANZ, M. Effects of axotomy and intraocular administration of NT4, NT3, and brain derived neurotrophic factor on the survival of adult rat retinal ganglion cells: a quantitative "in vivo" study. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v.37, 489-500, 1996.

PEREIRA, S. P.; ARAUJO, E. G. Chronic depolarization induced by veratridine increases the survival of rat retinal ganglion cells ‘in vitro’. *Int. J. Devl. Neuroscience*, pp. 01-07, 2000.

PÉREZ, M. T.; CAMINOS, E. Expression of brain-derived neurotrophic factor and of its functional receptor in neonatal and adult rat retina. *Neurosci. Lett.*, v. 183, pp. 96-99, 1995.

PINDOLIA, D.R.; NOTH, C.J.; XU, Y.X.; JANAKIRAMAN, N.; CHAPMAN, R.A.; GAUTAM, S.C. IL-4 upregulates IL-1-induced chemokine gene expression in bone marrow stromal cells by enhancing NF- κ B activation. *Hematopathol. Mol. Hematol.*, v.10, 171-185, 1996.

PRENZEN, N. et al. EGF receptor transactivation by G-protein coupled receptor requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF. *Nature*, v.402, 884-888, 1999.

QIAO, X.; GAO, H.; HOLLYFIELD, J.G. Brain derived neurotrophic factor mRNA expression in the normal and rd mouse retinas. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, v.35, 1497-1505, 1994.

QUELLE, F.W. et al. Cloning of murine Stat6 and human Stat6, Stat proteins that are tyrosine phosphorylated in responses to Il-4 and IL-13 but are not required for mitogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, v.15, 3336, 1995.

RABACCHI, S.A.; ENSINI, M.; BONFANTI, L.; GRAVINA, A. and MAFFELL. Nerve growth factor reduces apoptosis of axotomized retinal ganglion cells in the neonatal rat. *Neurosci.*, v.63, 969-973, 1994.

RAFF, M. C.; BARRES, B. A.; BURRE, J. F.; COLES, H. S.; ISHIZAKI, Y.; JACOBSON, M. C. Programmed cell death and the control of cell survival. *Lessons from the nervous system. Science.*, v.262, pp. 695-700, 1993.

RAJU, T. R.; BENNETT, M. R. Retinal ganglion cell survival requirements: A major but transient dependence on Müller glia during development. *Brain Res.*, v.383, pp. 165-176, 1986.

RATHMELL, J.C.; THOMPSON, C.B. The central effectors of cell death in the immune system. *Annu Rev. Immunol*, v.17, 781-828, 1999.

REESE, B. E.; COLELLO, R. J. Neurogenesis in the retinal ganglion layer of the rat. *Neurosci.*, v. 46, pp. 419-429, 1992.

RICKMAN, D. W.; BRECHA, N. C. Expression of the proto-oncogene, Trk, receptors in the developing rat retina. *Vis. Neurosci.*, v. 12, pp. 215-222, 1995.

ROSE-JOHN, S.; HEINRICH, P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function., *Biochem. J.*, v. 300, pp. 281-290, 1994.

ROTHWELL, N. J.; LUHESHI, G. N.; TOULMOND, S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology and pathology., *Pharmacol. Ther.*, v. 69, pp. 85-95, 1996.

RYAN, J.J.; MCREYNOLDS, L.J.; KEEGAN, A.; WANG, L.H.; GARFEIN, E.; ROTHMAN, P.; NELMS, K.; PAUL, W.E. Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor. *Immunity*, v.4, 123-132, 1996.

SALVESEN, G.S. Programmed cell death and caspases. *APMIS*, v.107, 73-79, 1999.

SAWADA, M.; SUZUMURA, A.; MARUNOUCHI, T. Cytokine network in the central nervous system and its roles in growth and differentiation of glial and neuronal cells. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 13 (3-4), pp. 253-264, 1995.

SAWAI, H.; CLARKE, D. B.; KITTELEROVÁ, P.; BRAY, G. M.; AGUAYO, A. J. Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 stimulate growth of axonal branches from regenerating retinal ganglion cells. *J. Neurosci.*, v. 16, pp. 3887-3894, 1996.

SHIMODA, K. et al. Lack of IL-4 induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat 6 gene. *Nature*, v. 380, 630-633, 1996.

SCHWANTZMAN, H. A.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis: The biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr. Rev.*, v.4, pp. 133-151, 1993.

SHOLL-FRANCO, A.; FIGUEIREDO, K. G. A.; ARAUJO, E. G. Interleukin-2 and interleukin-4 increase the survival of retinal ganglion cells in culture. *NeuroReport*, v. 12, 109-112, 2001.

SIKOVÁ, E. The extracellular space in the CNS: its regulation, volume and geometry in normal and pathological neuronal function. *Neuroscientist*, v. 3, 28-41, 1997.

SPALDING, K.L.; CUI, Q.; HARVEY, A.R. Retinal ganglion cell neurotrophin receptor levels and trophic requirements following target ablation in the neonatal rat. *Neuroscience*, v.131, 387-395, 2005.

STEVENS, B.; PORTA, S.; HAAK, L. L.; GALLO, V.; FIELDS, R. D. Adenosine: a neuron-glial transmitter promoting myelination in the CNS in response to actions potentials. *Neuron*, v.36, 855-868, 2002.

SUN, X.J. et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signaling. *Nature*, v.377, 173-177, 1995.

TAKAESHITA, T.; ASAO, H.; OHTANI, K.; ISHII, N.; KUMARA, S.; TANAKA, N.; MUNAKATA, H.; NAKAMURA, M.; SAGAMURA, K. Cloning of the gamma chain of the human IL-2 receptor. *Science*, v. 257, pp. 379-382, 1992.

TAKEDA, K. Essential role of Stat6 in IL-4 signaling. *Nature*, v.380, 627-630, 1996.

THANOS, S.; BÄRH, M.; BARDE, Y.A.; VANSELOW, J. Survival and axonal enlogation of adult rat retinal ganglion cells. *European Journal of Neuroscience*, v.1, 19-26, 1989.

VAUX, D. L.; KORSMEYER, S. J. Cell death in development. *Cell*, v.96, n° 3, 1999.

VECINO, E.; CAMINOS, E.; UGARTE, M.; MARTÍN-ZANCA, D.; OSBORNE, N.N. Immunohistochemical distribution of neurotrophins and their receptor in the rat retina and the effects of ischemia and reperfusion. *General Pharmacology*, v.30, 305-314, 1998.

VECINO, E.; GARCÍA-GRESPO, D.; GARCÍA, M.; MARTINEZ-MILLÁN, L.; SHARMA, S.C.; CARRASCAL, E. Rat retinal ganglion cells co-express brain derived neurotrophic factor (BDNF) and its receptor TrkB. *Vision research*, v.42, 151-157, 2002.

VELLA, A.; TEAGUE, T.K.; IHLE, J.; KAPPLER, J.; MARRACK, P. J. Interleukin-4 (IL-4) or IL-7 prevents the death of resting T cells: Stat6 is probably not required for the effect of IL-4. *Exp. Med.*, v.186, 325-330, 1997.

VILLEGAS, S. N.; POLETTA, F.A.; CARRI, N. G. Glia: A reassessment based on novel data on the developing and mature central nervous system. *Cell Biol. Int.*, v. 27, pp. 599-609, 2003.

VITETTA, E.S.; OHARA, J.; MYERS, C.; LAYTON, J.; KRAMMER, P.H.; PAUL, W.E. Serological, biochemical, and functional identity of B-cell stimulatory factor-1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J. Exp. Med.* 162, 1726-1738, 1985.

von BARTHELD, C. S. Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol. Histopathol.*, v. 13, pp. 437-459, 1998.

WANG, C.Y.; MAYO, M.W.; BALDWIN, A.S.Jr. TNF- α and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science*, 271, 781, 1996.

WANG, C.Y.; MAYO, M.W.; KORNELUK, R.G.; GOEDEL, D.V.; BALDWIN, A.S.Jr. NF-Kb antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*, v.281, 1680-1689, 1998.

WÄSSLE, H.; BOYCOTT, B. B. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.*, v. 71, pp. 447 - 480, 1991.

WELLS, J. A.; DEVOS, A. M. Hematopoietic receptor complexes., *Annu. Ver. Biochem.*, v. 65, pp. 609-634, 1996.

WIRJATIJASA F.; DEGHANI, F.; BLAHETA R.A.; KORF, H.W.; HAILER, N.P. Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *J. Neurosci. Res.* V.68, 579-587, 2002.

WUSTER, A.L.; RODGERS, V.L.; WHITE, M.F.; ROTHSTEIN, T.L.; GRUSBY M.J. Interleukin-4- mediated protection of primary B cells from apoptosis through Stat6-dependent up-regulation of Bcl-xL. *The Journal of Biological Chemistry*, v.277, 27169-27175, 2002.

XU, HP.; ZHAO, J.W.; YANG, XL. Expression of voltage-dependent calcium channel subunits in the rat retina. *Neuroscience Letters*, v.329, 297-300, 2002.

ZAMORANO, J.; KEEGAN, A.D. Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: y497 and y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis. *J. Immunol.*, v. 161, 859-867, 1998.

ZAMORANO, J.; WANG, H.Y.; WANG, L.M.; PIERCE, J.H.; KEEGAN, A.D. IL-4 protects cells from apoptosis via the insulin receptor substrate pathway and a second independent signaling pathway. *J.Immunol.*, v.157, 4926-4934, 1996.

ZAMORANO, J.; MORA, A.L.; BOOTHBY, M.; KEEGAN, A.D. NF- κ B plays an important role in the IL-4-induced protection from apoptosis. *International Immunology*, v.13, 1479-1487, 2001.

ZANELLATO, A.; COMELLI, M. C.; DAL-TOSO, R.; CARMINOTO, G. Developing rat retinal ganglion cells express the functional NGF receptor p140 trkA. *Dev. Biol.*, v. 159, pp. 105-113, 1993.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)